



Luís Miguel da Silva Sobral

Licenciado em Bioquímica

**Construção e caracterização de
mutantes dirigidos da CbiK^P de
Desulfovibrio vulgaris Hildenborough**

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em
Biotecnologia

Orientadora: Doutora Lúcia M. Saraiva,
Investigadora Principal com agregação, Instituto de
Tecnologia Química e Biológica da Universidade
Nova de Lisboa

Júri:

Presidente: Prof. Doutor Pedro Viana Baptista

Arguente: Prof. Doutor Pedro Brito Tavares



FACULDADE DE
CIÊNCIAS E TECNOLOGIA
UNIVERSIDADE NOVA DE LISBOA

Novembro de 2012



Luís Miguel da Silva Sobral

Licenciado em Bioquímica

**Construção e caracterização de
mutantes dirigidos da CbiK^P de
Desulfovibrio vulgaris Hildenborough**

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em
Biotecnologia

Orientadora: Doutora Lúcia M. Saraiva,
Investigadora Principal com agregação, Instituto de
Tecnologia Química e Biológica da Universidade
Nova de Lisboa

Júri:

Presidente: Prof. Doutor Pedro Viana Baptista

Arguente: Prof. Doutor Pedro Brito Tavares

Indicação dos direitos de cópia

Construção e caracterização de mutantes dirigidos da CbiK^P
de *Desulfovibrio vulgaris* Hildenborough

Luís Miguel da Silva Sobral

FCT/UNL

UNL

A Faculdade de Ciências e Tecnologia e a Universidade Nova de Lisboa têm o direito, perpétuo e sem limites geográficos, de arquivar e publicar esta dissertação através de exemplares impressos reproduzidos em papel ou de forma digital, ou por qualquer outro meio conhecido ou que venha a ser inventado, e de a divulgar através de repositórios científicos e de admitir a sua cópia e distribuição com objetivos educacionais ou de investigação, não comerciais, desde que seja dado crédito ao autor e editor.

O fim de uma viagem é apenas o começo de outra. É preciso ver o que não foi visto, ver outra vez o que se viu já, ver na Primavera o que se vira no Verão, ver de dia o que se viu de noite, com Sol onde primeiramente a chuva caía, ver a seara verde, o fruto maduro, a pedra que mudou de lugar, a sombra que aqui não estava. É preciso voltar aos passos que foram dados, para os repetir, e para traçar caminhos novos ao lado deles. É preciso recomeçar a viagem. Sempre. O viajante volta já."

José Saramago
in "Viagens a Portugal"

Agradecimentos

Gostaria de agradecer a todas as pessoas que me ajudaram diretamente ou indiretamente na realização desta dissertação:

Em primeiro lugar, gostaria de agradecer à Doutora Lígia Saraiva por ter aceitado ser minha orientadora e me ter recebido no seu laboratório, contribuindo para o meu desenvolvimento como jovem cientista e como pessoa. Agradeço ainda por toda a disponibilidade e por me ter ajudado a olhar para diversas situações de uma outra perspetiva, permitindo-me aprender imenso durante este ano da minha vida. Um sincero obrigado.

Aos meus colegas no *Molecular Genetics Of Microbial Resistance Lab*: Lígia, Marta, André, Filipa, Joana, Mafalda, Margarida, Sara, Fábio e Catarina, por terem contribuído para um ótimo ambiente no laboratório, pelas proveitosas discussões e pela sua total disponibilidade sempre que eu precisava de alguma ajuda. Gostaria de agradecer especialmente à Susana por me ter auxiliado nos primeiros passos no laboratório, ensinando-me imenso, pelo seu apoio, disponibilidade, confiança e sobretudo...paciência. Obrigado!

A todos os membros do 3º piso do ITQB, especialmente à Cláudia e à Isabel, pela sua ajuda nas mais diferentes tarefas e pela sua disponibilidade.

À minha família, em particular aos meus avós, por me terem apoiado como nunca ao longo deste ano, estando sempre disponíveis para me ensinar e aconselhar em relação a quase tudo. Aos meus pais e irmão por me terem acompanhado ao longo da minha vida pessoal e académica, tendo sido sempre grande parte dela, uma grande parte da minha pessoa depende deles. Aos meus tios, primos, padrinhos, bisavós e afilhado por terem sempre nutrido carinho por mim, apoiando-me e encorajando-me em todas as situações.

À Inês pelo seu amor incondicional, por me ter ouvido, aconselhado, apoiado e compreendido em todos os momentos. Obrigado por seres parte da minha vida.

Aos meus amigos: Miguel, Tiago, Rafael, Luís, Jorge, Vasco e João por terem estado sempre ao meu lado ao longo destes anos. Agradeço pela vossa compreensão, boa disposição e amizade. Estamos juntos.

Em último lugar, gostaria de homenagear o meu bisavô pelos seus ensinamentos e pela sua vida cheia de bons momentos, espero que descanse em paz. Dedico esta dissertação a ele e à sua memória.

Muito obrigado a todos.

Resumo

Desulfovibrio vulgaris Hildenborough é uma bactéria redutora de sulfato com um papel preponderante no ciclo do enxofre e com elevado interesse biotecnológico ao nível da biorremediação. Esta bactéria depende de tetrapirroles modificados que são cofatores em proteínas essenciais para o seu metabolismo, sendo estes formados numa via biossintética complexa onde, em cada ramificação, existe uma quelatase exclusiva que insere um metal específico no anel tetrapirrólico. Em *D. vulgaris* existem duas cobaltoquelatases, uma citoplasmática - CbiK^C - e outra periplasmática - CbiK^P - capazes de inserir cobalto ou ferro no tetrapirrole modificado sirohidroclorina. A CbiK^P é única dentro da família das quelatases, uma vez que contém 2 hemos *b*. A estrutura cristalográfica desta proteína revelou alguns resíduos de aminoácidos que parecem estar envolvidos na ligação do hemo, na manutenção da estrutura quaternária e no centro ativo. Para compreender a função destes resíduos na proteína, foram construídos variantes desta proteína recombinante mutados nos resíduos mais relevantes, comparando-os com a proteína selvagem. O estudo revela o único resíduo que liga o hemo e os aminoácidos relevantes na manutenção da estrutura quaternária. A atividade específica de inserção de metal na sirohidroclorina mostrou ser dependente de três resíduos e foram verificadas algumas variações na atividade de cobaltoquelatase e ferroquelatase, dependendo dos aminoácidos mutados. Foram também construídas proteínas com mutações duplas nos aminoácidos propostos como relevantes na ligação aos metais para avaliar a sua atividade enzimática. A capacidade da CbiK^P inserir ferro na sirohidroclorina *in vivo* foi também testada por complementação de uma estirpe de *E. coli* capaz de produzir sirohidroclorina mas incapaz de produzir sirohemo. Finalmente, estudou-se pela técnica de *Western Blot*, a localização celular da proteína CbiK^P nativa.

Termos-chave: bactérias redutoras de sulfato; biossíntese de tetrapirroles; quelatase; enzima; estrutura (proteína).

Abstract

Desulfovibrio vulgaris Hildenborough is a sulfate-reducing bacterium with an important role in the sulfur cycle and with a high level of biotechnological interest in bioremediation. This bacterium depends on modified tetrapyrroles that are cofactors in essential proteins in their metabolism. These tetrapyrroles are formed in a complex biosynthetic pathway which each branch contains a unique chelatase that inserts a specific metal into the tetrapyrrole ring. *D. vulgaris* has two cobaltochelataes, a cytoplasmatic - CbiK^C - and another periplasmatic – CbiK^P – that are able to insert cobalt or iron in the modified tetrapyrrole sirohydrochlorin. CbiK^P is unique within the chelatase family, since it contains two hemes *b*. The crystal structure of this protein revealed some amino acid residues that appear to be involved in the binding of heme, in the maintenance of the quaternary structure and in the active center. To understand the role of these residues in the protein, variants of this protein were constructed recombinantly with the most relevant residues mutated and compared to the wild type protein. The only residue that binds heme was revealed, as well as the amino acids important for the maintenance of the quaternary structure. The specific activity of the protein was shown to be dependent on three residues and some variations in the activity of cobaltochelatae and ferrochelatae, depending on the mutated amino acids. Two proteins were also constructed with double mutations in amino acids proposed as relevant in binding to metals to assess its enzymatic activity. The ability of CbiK^P to insert iron into sirohydrochlorin *in vivo* was also tested by complementation of a deficient *E. coli* strain capable of producing sirohydrochlorin, but unable to produce siroheme. Finally, the location of the native CbiK^P protein, using the Western Blot technique, was assessed.

Keywords: sulfate-reducing bacteria, tetrapyrrole biosynthesis; chelatase; enzyme; protein structure.

Índice de matérias

Capítulo I: Introdução.....	1
1. Bactérias redutoras de sulfato: o exemplo de <i>Desulfovibrio</i>	1
1.1. Perspetiva histórica.....	1
1.2. Respiração anaeróbia.....	1
1.2.1. Metabolismo.....	2
1.3. Distribuição das bactérias redutoras de sulfato.....	4
1.4. Classificação filogenética.....	4
1.5. O género <i>Desulfovibrio</i>	5
1.5.1. Relação com Humanos.....	7
1.5.2. Impacto na economia e no ambiente.....	7
2. Biossíntese de tetrapirroles.....	9
2.1. O papel dos tetrapirroles.....	9
2.1.1. Estrutura e nomenclatura.....	10
2.2. Biossíntese geral de tetrapirroles.....	11
2.2.1. Ácido 5-aminolevulínico.....	11
2.2.2. Porfobilinogénio.....	12
2.2.3. Hidroximetilbilano	13
2.2.4. Uroporfirinogénio III.....	13
2.2.5. Hemo.....	14
2.2.6. Sirohemo e vitamina B ₁₂	15
2.3. Biossíntese de tetrapirroles em <i>Desulfovibrio vulgaris</i> Hildenborough.....	17
3. As quelatações em bactérias.....	19
3.1. Classificação.....	19

3.1.1. Propriedades das quelatases do tipo II.....	20
3.2. As duas cobaltoquelatases de <i>Desulfovibrio vulgaris</i> Hildenborough.....	20
Capítulo II: Materiais e métodos.....	23
2.1. Expressão das proteínas recombinantes.....	23
2.2. Purificação das proteínas.....	23
2.3. Caracterização bioquímica.....	25
2.4. Complementação da estirpe $\Delta cysG$ de <i>E. coli</i> pelos mutantes dirigidos de CbiK ^P	28
2.5. Construção de mutações duplas de CbiK ^P	32
2.6. Localização celular da proteína CbiK ^P nativa.....	34
2.7. Técnicas correntes de laboratório.....	36
2.7.1. Protocolo geral de transformação bacteriana por choque térmico.....	36
2.7.2. Electroforese em gel de poliacrilamida em condições desnaturantes (SDS-PAGE).....	37
2.7.3. Quantificação de proteína pelo método do ácido bicinconínico (BCA).....	38
2.7.4. Quantificação de grupos hémicos pelo método do piridina hemocromo.....	39
2.7.5. Electroforese em gel de agarose.....	40
2.7.6. Protocolo de indução de competência pelo método do TB.....	41
2.7.7. <i>Western-Blot</i> e <i>Dot Blot</i>	41
Capítulo III: Resultados.....	43
3.1. Caracterização bioquímica.....	43
3.2. Complementação da estirpe $\Delta cysG$ de <i>E. coli</i> pelos mutantes dirigidos de CbiK ^P	48
3.3. Localização celular da proteína CbiK ^P nativa.....	50

Capítulo IV: Discussão de resultados.....	53
4.1. Caracterização bioquímica.....	53
4.2. Complementação da estirpe $\Delta cysG$ de <i>E. coli</i> pelos mutantes dirigidos de CbiK ^P	55
4.3. Localização celular da proteína CbiK ^P nativa.....	56
Capítulo V: Conclusão.....	57
Bibliografia.....	59
Anexos.....	63

Índice de figuras

Figura 1.1. Felix Hoppe-Seyler, um dos primeiros cientistas a reportar a redução de sulfato por microrganismos.....	1
Figura 1.2. Representação esquemática do ciclo do enxofre com ênfase nos principais processos e em quem os realiza.....	3
Figura 1.3. Árvore filogenética com ênfase na família <i>Desulfovibrionaceae</i> , que engloba a espécie <i>Desulfovibrio vulgaris</i>	5
Figura 1.4. Imagem TEM de <i>Desulfovibrio vulgaris</i> Hildenborough.....	6
Figura 1.5. Representação da numeração dos carbonos de um tetrapirrole.....	10
Figura 1.6. Via geral de biossíntese de tetrapirroles modificados que demonstra a elevada diversidade de produtos formados.....	11
Figura 1.7. Formação de porfobilinogénio a partir de ácido 5-aminolevulínico por ação da porfobilinogénio sintase.....	12
Figura 1.8. Formação de hidroximetilbilano a partir de porfobilinogénio por ação da porfobilinogénio desaminase.....	13
Figura 1.9. Formação de uroporfirinogénio III a partir de hidroximetilbilano por ação da uroporfirinogénio sintase.....	14
Figura 1.10. Estrutura química do hemo <i>b</i> , um dos hemos mais comuns na Natureza.....	15
Figura 1.11. Estrutura química do sirohemo.....	16
Figura 1.12. Estrutura química da vitamina B ₁₂	16
Figura 1.13. Esquema que pretende elucidar a biossíntese de tetrapirroles em <i>Desulfovibrio vulgaris</i> Hildenborough.....	17
Figura 1.14. Reação catalisada por uma quelatase.....	19
Figura 1.15. Estruturas cristalográficas de 3 CbiK/X.....	20
Figura 1.16. Estrutura cristalográfica da CbiK ^P de <i>Desulfovibrio vulgaris</i> Hildenborough	21

Figura 1.17. Perspetiva detalhada da cavidade central da CbiK ^P com ênfase no hemo <i>b</i> e nos resíduos que ligam o cobalto.....	22
Figura 2.1. Sistema de géis Mini-PROTEAN Tetra Cell da Biorad.....	37
Figura 2.2. Sistema de géis Mini-Sub Cell GT da Biorad utilizado na corrida de géis de agarose	40
Figura 3.1. Esquematização do progresso nos passos de purificação adotados.....	43
Figura 3.2. Esquema de purificação utilizado na purificação da proteína CbiK ^P selvagem e dos 7 mutantes dirigidos.....	44
Figura 3.3. Gel de SDS-PAGE 12,5 % com a CbiK ^P selvagem.....	44
Figura 3.4. Espectro de UV/visível obtido para a proteína recombinante E76L-CbiK ^P na sua forma oxidada.....	45
Figura 3.5. Espectro de UV/visível obtido para a proteína recombinante H96L-CbiK ^P na sua forma oxidada, onde se verifica a ausência de hemo <i>b</i>	45
Figura 3.6. Espectro de UV/visível obtido para a sirohidroclorina produzida anaerobiamente	47
Figura 3.7. DNA de 3 genes mutados de CbiK ^P após amplificação com Vent DNA polimerase em gel de agarose 1% e marcador 1Kbp da Promega.....	49
Figura 3.8. Mutantes dirigidos de CbiK ^P digeridos com Nde I/Hind III em gel de agarose 1% com marcador 1 Kbp da Promega.....	49
Figura 3.9. pETac isolado em gel de agarose 1% com marcador 1 Kbp da Promega.....	49
Figura 3.10. Complementação de <i>E. coli</i> 302Δa-pCIQ- <i>sirCcobA</i> pelos mutantes dirigidos de CbiK ^P em placa de meio mínimo M9 sem cisteína.....	49
Figura 3.11. Complementação de <i>E. coli</i> 302Δa-pCIQ- <i>sirCcobA</i> pelos mutantes dirigidos de CbiK ^P em placa de meio mínimo M9 com cisteína.....	50
Figura 3.12. Controlo negativo efetuado para o ensaio com <i>E. coli</i> 302Δa-pCIQ- <i>sirCcobA</i> em meio mínimo M9 na ausência e presença de cisteína.....	50

Figura 3.13. Membrana de nitrocelulose após <i>Dot Blot</i> onde é visível o reconhecimento da proteína CbiK ^P pelo seu anticorpo primário.....	51
Figura 3.14. Membranas de nitrocelulose para os 3 protocolos utilizados no fracionamento celular de <i>Desulfovibrio vulgaris</i> Hildenborough.....	51
Figura 3.15. Membrana de nitrocelulose usada no <i>Western Blot</i> realizado com citocromo c3 de <i>Desulfovibrio vulgaris</i> Hildenborough e o seu anticorpo específico.....	52

Índice de tabelas

Tabela 1.1. Comparação de características gerais entre algumas espécies de <i>Desulfovibrio</i>	6
Tabela 2.1. Programa de purificação utilizado na IMAC Sepharose HP de 25 mL.....	24
Tabela 2.2. Programa de purificação utilizado na Q-Sepharose HP de 25 mL.....	25
Tabela 2.3. Padrões utilizados na construção da reta de calibração para avaliar a estrutura quaternária das proteínas analisadas.....	26
Tabela 2.4. Concentração final, por reação, dos componentes utilizados na amplificação dos genes resultantes das mutações dirigidas de CbiK ^P	28
Tabela 2.5. Concentração dos componentes utilizados na digestão dos 7 mutantes dirigidos de CbiK ^P	29
Tabela 2.6. Concentração dos componentes utilizados na digestão do plasmídeo pETac.....	29
Tabela 2.7. Concentração dos componentes utilizados nos PCR de colónias referidos.....	30
Tabela 2.8. Concentração dos componentes utilizados na digestão do DNA dos mutantes dirigidos de CbiK ^P clonados no plasmídeo pETac.....	31
Tabela 2.9. Composição do meio mínimo M9 utilizado nos ensaios de complementação.....	32
Tabela 2.10. Concentração dos componentes utilizados nas mutações duplas dirigidas de CbiK ^P	33
Tabela 2.11. Composição do meio <i>Wall</i> utilizado no crescimento de <i>Desulfovibrio vulgaris</i> Hildenborough	34
Tabela 2.12. Composição dos géis de SDS-PAGE 12,5% utilizados em várias etapas da caracterização e purificação de proteínas.....	37
Tabela 2.13. Reta de calibração utilizada na aplicação do método de BCA para quantificação de proteínas.....	39

Tabela 3.1. Concentração obtida por BCA das proteínas purificadas, número de hemo <i>b</i> por proteína pelo método piridina hemocromo e número de subunidades por proteína.....	46
Tabela 3.2. Atividades específicas de cobaltoquelatase e ferroquelatase de CbiK ^P e dos 7 mutantes dirigidos.....	48
Tabela 4.1. Tabela comparativa das atividades de cobaltoquelatase e ferroquelatase por parte de vários microrganismos	54

Lista de abreviaturas e siglas

ADP	Adenosina difosfato
Ahb	<i>Alternative heme biosynthetic</i>
ALA	Ácido 5-aminolevulínico
ALAD	Ácido 5-aminolevulínico desidratase
ALAS	Ácido 5-aminolevulínico sintase
AMP	Adenosina monofosfato
APS	Adenosina fosfosulfato
ATP	Adenosina trifosfato
BCA	Ácido bicianconínico
bp	<i>base pair</i>
BRS	Bactérias redutoras de sulfato
CPDH	Coproporfirinogénio III desidrogenase
CPO	Coproporfirinogénio III oxidase
DEAE	Dietilaminoetil
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DO	Densidade óptica
DTT	Ditiotreitol
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
FAD	Flavina-adenina dinucleotídeo
FC	Ferroquelatase
Glutr	Glutamil-tRNA redutase
GSA	Glutamato-1-semialdeído
GSAM	Glutamato-1-semialdeído-2,1-aminomutase
HMB	Hidroximetilbilano
HP	<i>High performance</i>
IPTG	Isopropil- β -D-tiogalactosídeo
kDa	kilodalton
LA	Luria Agar
LB	Luria Bertani
NAD	Nicotinamida adenina dinucleotídeo, forma oxidada
NADH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo, forma reduzida
NADP	Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato, forma oxidada
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato, forma reduzida
NEB	<i>New England Biolabs</i>
NiR	Nitrato redutase
P.e.	Por exemplo
PBG	Porfobilinogénio
PBGD	Porfobilinogénio desidratase
PBGS	Porfobilinogénio sintase
PBS	Phosphate buffered saline
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i>
PLP	Piridoxal 5-fosfato

PPIX	Protoporfirina IX
PPO	Protoporfirina IX oxidase
RNA	Ácido ribonucleico
rpm	Rotações por minuto
SAM	S-adenosilmetionina
SDS	Docedil sulfato de sódio
SDS-PAGE	<i>Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis</i>
SOB	<i>Super optimal broth</i>
SOC	<i>Super optimal with catabolite repression</i>
URO III	Uroporfirinogénio III
UROD	Uroporfirinogénio III descarboxilase
UROM	Uroporfirinogénio III metiltransferase
UROS	Uroporfirinogénio III sintase
UV	Ultravioleta
Δ	Deleção

Aminoácidos

G	Gli	Glicina
A	Ala	Alanina
L	Leu	Leucina
M	Met	Metionina
F	Fen	Fenilalanina
W	Tri	Triptofano
K	Lis	Lisina
Q	Gln	Glutamina
E	Glu	Glutamato
S	Ser	Serina
P	Pro	Prolina
V	Val	Valina
I	Ile	Isoleucina
C	Cis	Cisteína
Y	Tir	Tirosina
H	His	Histidina
R	Arg	Arginina
N	Asn	Asparagina
D	Asp	Aspartato
T	The	Treonina

Capítulo I - Introdução

1 - Bactérias redutoras de sulfato: o exemplo de *Desulfovibrio*

1.1 - Perspetiva histórica

Em meados da década de 60 do século XIX, Meyer e Cohn [1] identificaram pela primeira vez em ambientes aquáticos, uma quantidade significativa de sulfureto de hidrogénio (H_2S) proveniente da redução biológica de sulfato. Em 1886 o cientista alemão Felix Hoppe-Seyler (Figura 1.1) verificou a oxidação completa de celulose em meios de cultura anaeróbios com lodo, utilizando pedra de gesso (CaSO_4) como fonte de sulfato e originando o mesmo gás de cheiro desagradável [2]. Esta foi uma das primeiras respirações anaeróbias realizadas por procariontes a ser estudada e indicava que estes são capazes de viver em ambientes diversificados na ausência de oxigénio. Assim se compreendeu que estes têm uma elevada adaptabilidade que lhes permite acoplar a oxidação de substratos orgânicos à redução de compostos inorgânicos (além de O_2) de forma a conservar energia, possibilitando o seu crescimento em condições anaeróbias.

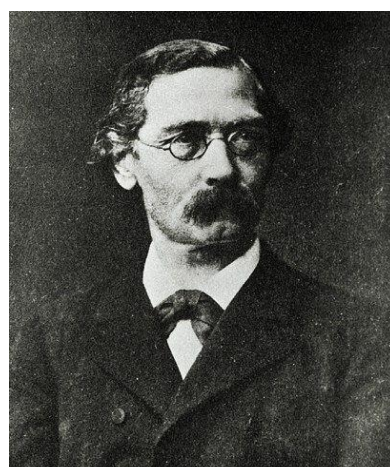


Figura 1.1 - Felix Hoppe-Seyler, um dos primeiros cientistas a reportar a redução de sulfato por microrganismos.

1.2 - Respiração anaeróbia

Alguns compostos que atuam como aceitadores terminais de eletrões podem ser reduzidos por procariontes na ausência de oxigénio, são eles, por exemplo: nitrato, ferro férrico, dióxido de carbono, sulfato e outras espécies de enxofre. Em alguns casos, até o dador de eletrões pode ter origem inorgânica, resultando numa reação de oxidação-redução estritamente inorgânica, e por isso denominada litotrófica [3]. De um modo geral, substratos reduzidos são oxidados sequencialmente enquanto intermediários coenzimáticos (NAD - nicotinamida adenina dinucleotídeo e FAD - flavina-adenina dinucleótido) efetuam a transferência de eletrões para um aceitador final, recorrendo a um gradiente eletroquímico ao longo da membrana. Esta translocação permite a produção de fosfatos de elevada energia, como é o caso do trifosfato de adenosina (ATP) que fornece a energia necessária à manutenção, biossíntese e sinalização celular. Tal ocorre por oposição à fermentação, onde a fosforilação ao nível do substrato é

responsável pela produção de energia. Apesar de o O_2 não ser o aceitador final de elétrons, o processo é similar à respiração aeróbia e, como tal, é designado por respiração anaeróbia.

Em geral, os eucariontes superiores são capazes de oxidar um número estrito de substratos, entre os quais açúcares, aminoácidos e lípidos; ao contrário dos procariontes que não só utilizam os anteriormente referidos, como também hidrogénio molecular, amónia, biopolímeros, detergentes e outros compostos orgânicos de origem natural ou xenobiótica. A respiração anaeróbia não é comum entre eucariontes, o único caso reportado até à data é o da redução de nitrato por parte de um flagelado [4].

Comparando o rendimento energético da respiração anaeróbia com a aeróbia e tomando como exemplo a oxidação completa da glucose, constatamos que a primeira corresponde apenas a 67% dos 2813 kJ mol^{-1} da segunda, quando o nitrato é o aceitador final de elétrons. Se tivermos em conta os casos do fumarato, do sulfato e do dióxido de carbono, este rendimento é ainda menor. Os rendimentos de crescimento por fermentação são ainda tipicamente inferiores quando confrontados com os da respiração aeróbia, assim como os rendimentos de conservação de energia [5].

1.2.1 - Metabolismo

De entre os vários tipos de respirações anaeróbias conhecidas, a redução das espécies de enxofre é das mais relevantes, uma vez que este é um dos elementos mais abundantes no planeta Terra, encontrando-se essencialmente presente como pirite (FeS_2) e pedra de gesso ($CaSO_4$) em rochas e sedimentos, ou como sulfato em ambientes marinhos. O enxofre apresenta uma vasta gama de estados de oxidação que podem ir desde - 2 a + 6 (completamente reduzido e oxidado, respetivamente) resultando num ciclo do enxofre bastante complexo que está ainda intimamente ligado aos ciclos do carbono e do azoto. De um ponto de vista bioquímico, o enxofre pode fazer ligações com o hidrogénio, carbono e oxigénio, mas também pontes dissulfureto. Além disso, todos os estados de oxidação inferiores a + 6 (sulfato) são bastante reativos e capazes de se interconverter ou auto-oxidar à temperatura ambiente. A espécie de enxofre mais estável termodinamicamente é o sulfato, o que lhe permite ser a base de todo o ciclo do enxofre, dado que este é utilizado pelos microrganismos como nutriente e reduzido a sulfureto para depois ser incorporado em aminoácidos e enzimas que contêm enxofre (Figura 1.2) [6]. Este processo é denominado redução de sulfato por assimilação e pode então gerar, por exemplo, enxofre para a biossíntese de cisteínas. Posto isto, estamos perante um caminho metabólico que se limita apenas a satisfazer necessidades nutricionais [7].

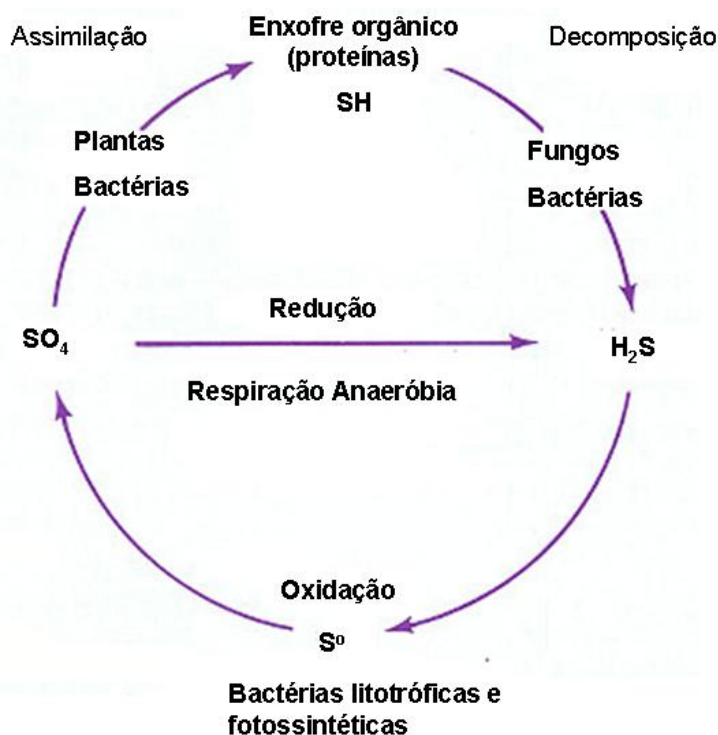


Figura 1.2 - Representação esquemática do ciclo do enxofre com ênfase nos principais processos e em quem os realiza.

Por outro lado, a redução de sulfato por dissimilação envolve a oxidação de compostos orgânicos ou de hidrogénio molecular (H_2) acoplada à redução de sulfato (SO_4^{2-}) a sulfureto (H_2S , HS^-), gera energia e sulfureto de hidrogénio em grandes quantidades. Para que a redução biológica seja possível é necessário que ocorra a ativação do sulfato, já que o potencial redox do par sulfato/bissulfito é de - 516 mV, ou seja, bastante negativo para possibilitar a redução pela ferredoxina ou NADH (mediadores intracelulares de eletrões cujos potenciais redox são - 398 mV e - 314 mV). Antes da sua redução, o sulfato é então ativado por uma ATP sulfurilase que leva à formação de adenosina fosfosulfato (APS) e pirofosfato que é hidrolisado pela pirofosfatase a 2-fosfato. Assim, o par redox APS/sulfito + AMP – adenosina monofosfato (com um potencial de redução de - 60 mV) permite a redução do APS pelos mediadores anteriormente referidos, enquanto o AMP gerado pela redução é convertido em duas moléculas de ADP (adenosina difosfato) pela enzima dependente de ATP, a adenilato cinase. Assim ocorre um gasto de duas moléculas de ATP para ativar o sulfato, que depois são recuperadas [6].

As bactérias redutoras de sulfato (BRS) são consideradas anaeróbias estritos, mesmo que algumas espécies possam tolerar ou até reduzir oxigénio [8, 9] por um período de tempo limitado, mas também são capazes de se desenvolver utilizando sulfitos, tiosulfato, enxofre ou nitrato como aceitadores de eletrões alternativos [10]. Assim sendo, e apesar de terem sido denominados por apenas um dos substratos que são capazes de reduzir, estes microrganismos

são conhecidos por utilizar uma grande variedade de compostos de baixa massa molecular, como ácidos alifáticos mono e dicarboxílicos, álcoois, compostos polares aromáticos e hidrocarbonetos. A oxidação de compostos orgânicos pode ser incompleta, levando à formação de acetato como produto final (e por vezes CO₂ parcialmente), ou completa originando apenas CO₂. A oxidação incompleta de substratos orgânicos ocorre devido à ausência de um mecanismo para a oxidação terminal de acetil-coenzima A e esta é uma das diferenças metabólicas fundamentais que ajuda a distinguir entre as bactérias redutoras de sulfato.

1.3 - Distribuição das bactérias redutoras de sulfato

As BRS podem ser encontradas em locais onde compostos orgânicos se acumulam na presença de sulfato em condições anóxicas. O seu desenvolvimento tolera desde as águas mais frias até às mais quentes, permitindo-lhes uma elevada adaptação a diferentes habitats naturais ou modificados por ação do Homem. Alguns destes locais incluem arrozais, solos alagados [2], fontes hidrotermais, vulcões de lama, gasodutos, solos hipersalinos e até em ambientes com concentrações de oxigénio saturantes [11]. Foram também detetados em ambientes onde ocorre formação de ácido sulfúrico (H₂SO₄) por microrganismos que realizam a oxidação de minerais ricos em sulfuretos onde o pH é bastante ácido [12], ou em lagos ricos em carbonato de sódio onde o pH pode ir até 10. Além de tolerarem uma elevada variação de pH, as BRS também já foram identificadas em campos de petróleo, subsolos profundos, na rizosfera de plantas, em aquíferos e outros locais engenheirados, como em estações de tratamento de águas residuais [13].

1.4 - Classificação filogenética

Durante a década de 60, Campbell e Postgate (1965 e 1966) [10] classificaram as bactérias redutoras de sulfato em dois grupos distintos: as estirpes formadoras de esporos deram origem ao género *Desulfotomaculum*, e as não formadoras de esporos e com forma de vibriões foram descritas como espécies de *Desulfovibrio*. Mas cedo se percebeu que esta classificação não era representativa do género, visto que vários estudos bioquímicos de interação metabólica e os primeiros passos na biologia molecular davam azo a novas interpretações. Algumas destas ideias persistiram até ao início dos anos 80, isto porque era comum classificar as BRS com base apenas em características fenotípicas como a nutrição e a morfologia. No entanto, com o desenvolvimento da análise do RNA ribossomal foi possível destrinçar com maior precisão as relações filogenéticas entre estes microrganismos com a comparação das sequências de rRNA 16S e foram sugeridas duas famílias na subclasse δ-Proteobacteria: a *Desulfovibrionaceae* e a *Desulfobacteriaceae* [14].

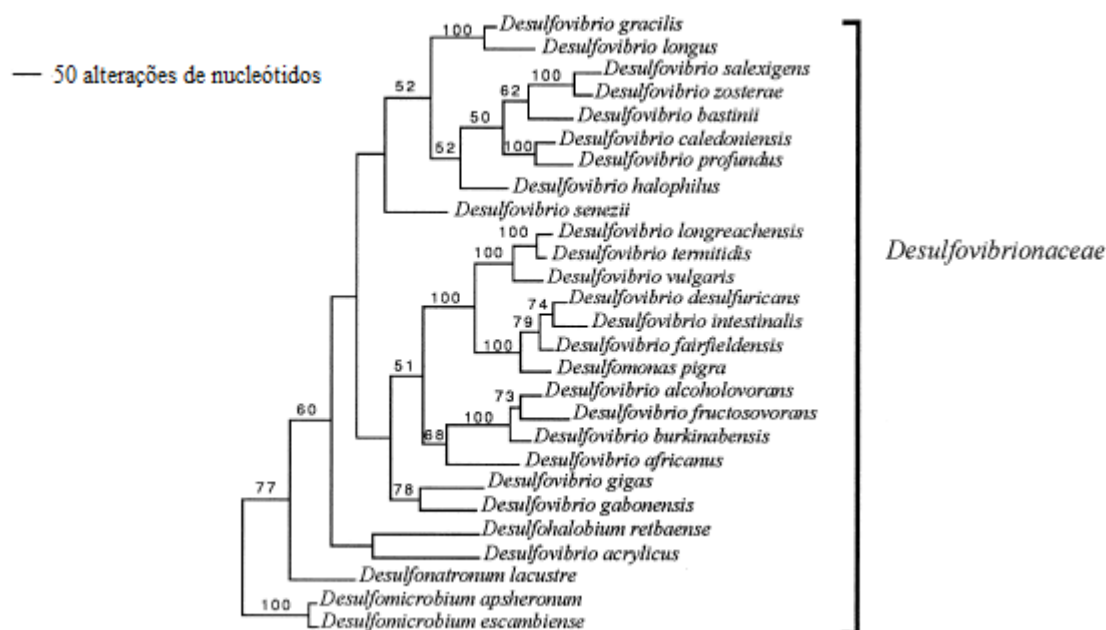


Figura 1.3 - Árvore filogenética com ênfase na família *Desulfovibrionaceae*, que engloba a espécie *Desulfovibrio vulgaris* (adaptado de [15]).

Devido à sua elevada heterogeneidade [16], as bactérias redutoras de sulfato são agrupadas de acordo com uma conjugação dos vários fatores mencionados e outros parâmetros como a forma celular (vibriões, bastonetes, coccus), motilidade, conteúdo em GC, temperatura ótima, entre outras, para tentar agrupar as bactérias redutoras de sulfato. A análise do RNA ribossomal 16S permitiu que estas fossem divididas em 4 grupos: archaea termofílicas; bactérias termofílicas, Gram-positivas formadoras de esporos e Gram-negativas mesofílicas [15]. Este último grupo compreende as bactérias redutoras de sulfato da subclasse das δ -Proteobacteria que inclui a família *Desulfovibrionaceae* e por consequência, o género *Desulfovibrio*.

1.5 - O género *Desulfovibrio*

No ano de 1895, o holandês Beyerinck divulgou que tinha isolado dos canais da cidade de Delft aquilo que viria a chamar *Spirillum desulfuricans*. Tal foi possível devido à contaminação dos esgotos que originou enormes quantidades de sulfureto de hidrogénio com maior predominância nos meses de Verão. Beyerinck foi capaz de isolar e enriquecer colónias em agar que apresentavam um precipitado negro, típico de sulfureto de ferro e bactérias em forma de bastonetes curvos, não deixando qualquer dúvida que tinha sido capaz de isolar as primeiras espécies de *Desulfovibrio* [17]. Este género caracteriza-se por bactérias Gram-negativas não formadoras de esporos, com forma de vibrião e ocasionalmente sigmoide ou espiral. São capazes de crescer num meio com lactato/sulfato e numa gama de temperatura entre 30 e 37 °C, apresentando ainda um flagelo que lhes confere motilidade [18]. O seu conteúdo em

GC é normalmente elevado e podem ser encontrados em locais de água doce ou salgada, em solos, lodo marinho, entre muitos outros.

Desulfovibrio foi o primeiro microrganismo anaeróbio onde foi detetado um citocromo, mais concretamente o citocromo c3 tetrahémico que foi cristalizado nos anos 70 por Dervartanian e LeGall [19]. Além disso, a presença de hidrogenases revelou-se muito comum e a primeira a ser cristalizada foi uma das hidrogenases de *Desulfovibrio gigas*, a hidrogenase de níquel e ferro [20].

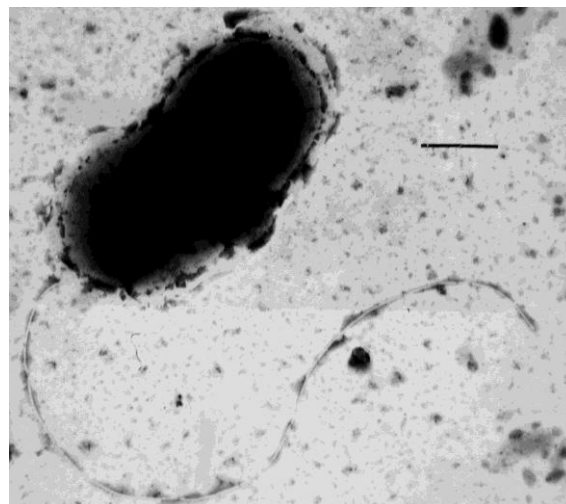


Figura 1.4 - Imagem TEM (*Transmission electron microscopy*) de *Desulfovibrio vulgaris* Hildenborough.

Atualmente existem mais de 30 espécies de *Desulfovibrio* propostas, onde algumas das mais estudadas são *Desulfovibrio desulfuricans*, *Desulfovibrio vulgaris*, *Desulfovibrio gigas*, *Desulfovibrio salexigens* e *Desulfovibrio piger*. Todas elas são filogeneticamente próximas com a particularidade de este género apresentar enorme diversidade entre as bactérias redutoras de sulfato, levando Postgate [21] a dizer que “a taxonomia do género é imperfeita”, ainda assim o fenótipo das espécies referidas é bastante similar (Tabela 1.1) [14, 22]. A primeira bactéria redutora de sulfato a ter o genoma sequenciado foi a espécie *Desulfovibrio vulgaris* Hildenborough, permitindo que este seja um microrganismo modelo para o estudo do impacto das bactérias redutoras de sulfato no ciclo do enxofre, para utilização biotecnológica e para o próprio estudo das BRS [23].

Tabela 1.1 - Comparação de características gerais entre algumas espécies de *Desulfovibrio*. +, ocorre; -, não ocorre; (+), ocorre vagamente; NR, não reportado (adaptado de [22]).

Espécies de <i>Desulfovibrio</i>	Forma	Conteúdo em G+C (%)	Motilidade	Oxidação	Dador de electrões								
					Hidrogénio	Formato	Lactato	Etanol	Acetato	Ácidos gordos	Fumarato	Malato	Benzoato
<i>desulfuricans</i>	Vibrião	59	+	Incompleta	+	+	+	+	-	-	+	+	-
<i>vulgaris</i>	Vibrião	65	+	Incompleta	+	+	+	(+)	-	-	-	-	-
<i>gigas</i>	Vibrião	65	+	Incompleta	+	+	+	(+)	-	-	+	+	-
<i>salexigens</i>	Vibrião	49	+	Incompleta	+	+	+	+	-	-	NR	+	-
<i>piger</i>	Bastonete	66	-	Incompleta	+	-	+	+	-	-	-	NR	NR

1.5.1 - Relação com Humanos

Em geral, é possível encontrar várias espécies de *Desulfovibrio* no trato gastrointestinal de Humanos devido à sua ubiquidade na natureza, podendo também atuar como patógenos oportunistas em situações onde ocorrem infecções abdominais. Um caso reportado nos Estados Unidos dá conta de um homem idoso que se queixava de febres constantes sem qualquer outro sintoma, vindo-se mais tarde a perceber que este possuía *Desulfovibrio desulfuricans* na sua corrente sanguínea [24]. Este caso é quase único para esta espécie de *Desulfovibrio*, já que *Desulfovibrio fairfieldensis* é o microrganismo recorrentemente encontrado em casos de bacteremia.

Embora comumente se induza que a presença de *Desulfovibrio* no corpo humano seja uma das razões para originar doenças inflamatórias intestinais, esta ideia nunca foi confirmada. Tal foi avaliado quando foram analisadas as fezes de vários pacientes que apresentavam doença de Crohn e colite ulcerosa e perceberam que apesar de as espécies *Desulfovibrio piger*, *Desulfovibrio vulgaris* Hildenborough e *Desulfovibrio* sp. NY682 estarem presentes, a sua abundância relativa nos pacientes doentes e após tratamento era similar; assim como em pessoas saudáveis [25]. Por outro lado, estudos recentes sugerem que *Desulfovibrio* tenha impacto no autismo regressivo, visto que estas bactérias foram identificadas com maior abundância em portadores da doença por comparação com pessoas saudáveis [26]. Assim, são necessários mais dados para inferir a influência destas bactérias em Humanos.

1.5.2 - Impacto na economia e no ambiente

As bactérias redutoras de sulfato são usualmente responsáveis pela biocorrosão de vários metais, fenómeno que obriga muitas empresas a despenderem imensas verbas na substituição de infraestruturas resultando num prejuízo indesejado. Os metais, especialmente o ferro, servem como substrato para que possa ocorrer a corrosão eletroquímica dos mesmos, possibilitando a dissolução do metal e dando origem a hidrogénio que é consumido pelas bactérias aquando da redução de sulfato [6]. É nos oceanos que os níveis de sulfato são mais elevados e onde se verifica maior impacto destas bactérias, especialmente as do género *Desulfovibrio* que são invariavelmente predominantes nesses ambientes [27, 28]. Além disso, a utilização recorrente de ácido sulfúrico na indústria faz com que as águas residuais acumulem sulfato que após redução origina sulfuretos, causando mau cheiro e contaminação do ar.

Apesar de alguns aspetos negativos, é igualmente possível aproveitar a capacidade que estas bactérias têm de produzir hidrogénio, especialmente *Desulfovibrio vulgaris* que é

consensualmente reconhecida por conter hidrogenases, permitindo a sua imobilização num eléctrodo que consequentemente funciona como biocátodo numa célula de electrólise microbiana [29]. A redução do sulfato também tem propriedades biotecnológicas passíveis de serem exploradas, tomando como exemplo a remoção de metais pesados de águas residuais e subterrâneas recorrendo à sua precipitação e posterior reutilização [30].

A utilização de espécies de *Desulfovibrio* na biorremoção de crostas negras de rochas com significado histórico possibilitando a sua conservação e restauro, foi outra das utilidades demonstradas por estas bactérias [31]. Outro estudo aponta para uma aplicação inovadora baseada na produção de antibióticos de largo espectro pela espécie *Desulfovibrio desulfuricans*, estes compostos encontram-se ainda em desenvolvimento para entender melhor a manifestação da atividade antimicrobiana, mas abrem novas portas na sua aplicação biotecnológica [32].

2 - Biossíntese de tetrapirroles

2.1 - O papel dos tetrapirroles

Os tetrapirroles compreendem um grupo vasto de moléculas com cor e que desempenham um papel determinante em vários sistemas biológicos. É comum dar como exemplo a cor verde das plantas que tem origem no elevado conteúdo em clorofilas. Estas moléculas contêm um ião magnésio no centro da porfirina ligado a quatro átomos de azoto e são responsáveis pelo processo de fotossíntese [33]. Além das clorofilas, os hemos são provavelmente os tetrapirroles cíclicos mais comuns na natureza e estes dois em conjunto com as bacterioclorofilas, o sirohem, o hemo d₁, a vitamina B₁₂ (cobalamina) e o cofator F₄₃₀ (que está apenas presente em microrganismos do domínio Archea [34]) são os exemplos mais recorrentes.

O hemo contém um ião ferro no centro da porfirina e é o conhecido cofator da hemoglobina, conferindo-lhe a cor vermelha que lhe é característica. Este tetrapirrole é determinante em várias funções celulares em microrganismos; quando é cofator de proteínas estas recebem o nome de hemoproteínas e podem ter as seguintes funções: transporte de eletrões em reações redox, armazenamento e transporte de oxigénio e ativação de oxigénio para facilitar a oxidação de substratos. Em particular, nos procariontes os citocromos são as hemoproteínas mais abundantes, transferindo eletrões ao longo da cadeia respiratória para culminar na aceitação de eletrões por parte do oxigénio. Ainda assim, a presença de hemos não é exclusiva de organismos aeróbios e tal facto indica que também terão um papel preponderante na respiração anaeróbia ou em outras funções necessárias à prevalência de microrganismos anaeróbios.

O sirohem tem uma cor amarelo-esverdeada e contém um ião ferro no centro do tetrapirrole, que se torna fundamental na sua capacidade de transferir seis eletrões na redução de sulfito ou assimilação de nitrito [35].

O hemo d₁ é um pigmento verde que atua nas nitrito redutases e que se pensa ser sintetizado a partir do sirohem como adaptação a uma alteração de ambiente e numa perspetiva evolutiva [36]. A vitamina B₁₂, na sua forma biológica de cobalamina (adenosilcobalamina e metilcobalamina), contém o ião cobalto que lhe confere uma cor roxa/rosa e é conhecida por ser um dos mais complexos tetrapirroles com uma função importante em vários processos metabólicos e de grande versatilidade [37]. Com uma cor amarelada e um ião níquel na sua

composição, o cofator F_{430} é o grupo prostético da metil coenzima M redutase que catalisa o último passo na formação de metano pelas archaea metanogénicas [34].

2.1.1 - Estrutura e nomenclatura

As porfirinas são constituídas por um sistema conjugado de quatro monopirroles ligados por grupos metino com duas ligações N-H em pontos opostos e dois grupos imina, quando estas se encontram na sua conformação mais estável [38]. Os anéis que compõem o macrociclo são denominados segundo as regras IUPAC, onde todos os carbonos do tetrapirrole estão numerados a partir de um número fixo e as posições meso entre pirroles estão identificadas como 5,10,15 e 20 (Figura 1.5) [39].

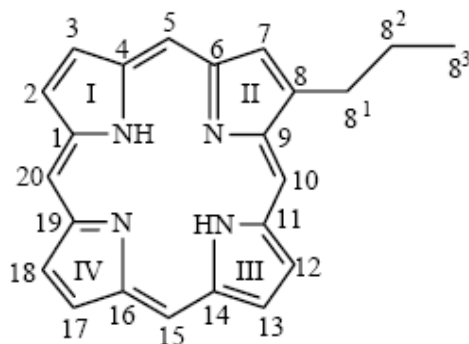


Figura 1.5 - Representação da numeração dos carbonos de um tetrapirrole (a partir de um ponto fixo, segundo as regras IUPAC [38]).

O centro da porfirina é, como referido anteriormente, capaz de incorporar um ião metálico, podendo adotar diferentes estados de oxidação. O nome hemo é usualmente relativo ao protohemo ou hemo *b*, sendo estes definidos pela introdução de um ião ferroso no centro de uma protoporfirina IX (assim intitulada devido aos quatro grupos metil, dois grupos vinil e dois ácidos propiónicos). No caso dos dois grupos vinil estarem ligados covalentemente a átomos de enxofre (por exemplo: de cisteínas), temos um hemo *c* que é o grupo prostético dos citocromos *c*. Já se um dos ácidos propiónicos for oxidado (a lactona, p.e.), obtém-se um hemo *d* que é típico de algumas oxidases terminais.

2.2 - Biossíntese geral de tetrapirroles

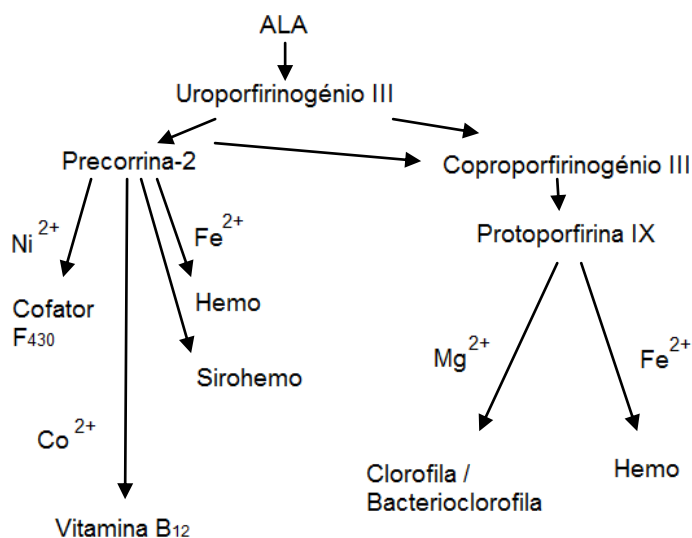


Figura 1.6 – Via geral de biossíntese de tetrapirroles modificados que demonstra a elevada diversidade de produtos formados.

A biossíntese de tetrapirroles constitui um dos temas mais estudados no âmbito da bioquímica, mas apesar de tão estudado é daqueles que maior diversidade e mais informação ainda necessita para se compreender melhor a forma como os diferentes seres vivos utilizam estes tetrapirroles como cofatores em proteínas essenciais no seu metabolismo. Os organismos eucariontes são apenas capazes de produzir hemo, sirohemo, clorofila e bilinas (pigmentos presentes na bÍlis), enquanto os procariontes são também capazes de originar tetrapirroles mais complexos como é o caso de corrinóides, cofator F₄₃₀, hemo d₁ e cobalamina. Os primeiros passos da biossíntese são comuns a todos os tetrapirroles e é sobre esses que nos debruçaremos primeiro.

2.2.1 - Ácido 5-aminolevulínico

O precursor comum de todos os tetrapirroles tem o nome de ácido 5-aminolevulínico (δ -ALA), uma aminocetona que pode ser originada por duas vias alternativas: 1) a via de C₅ [40] considerada mais ancestral, é utilizada pela maior parte das bactérias, archaea, planta e algas; 2) a via de Shemin é mais comum em mamíferos, leveduras, fungos e algumas proteobactérias.

A via de C₅ tem início num glutamato e envolve três passos enzimáticos onde este é inicialmente ativado no grupo carboxilo α por ligação a um tRNA^{Glu} por ação da glutamil-tRNA sintase na presença de ATP e magnésio (de notar que a formação de δ -ALA é o único passo que requer gasto de ATP na biossíntese de hemos). Desta forma obtém-se um glutamil-tRNA que é

posteriormente reduzido a glutamato-1-semialdeído (GSA) por catálise da glutamil-tRNA redutase (GluTR) que depende de NADPH [41]. No último passo o GSA é convertido a δ -ALA por intermédio da enzima glutamato-1-semialdeído-2,1-aminomutase (GSAM) numa reação dependente de piridoxamina ou piridoxal 5-fosfato (PLP) [40].

Na via de Shemin, a ALA sintase (ALAS) é uma proteína homodimérica codificada pelo gene *hemA* e também necessita de piridoxal 5-fosfato como cofator para catalisar a condensação de succinil-CoA e glicina. Desta feita, o primeiro passo é estabelecido pela ligação da glicina à enzima ocorrendo uma desprotonação no carbono α da glicina que leva à condensação com succinil-CoA. Assim, existe libertação de coenzima A, dióxido de carbono e δ -ALA [42]. Até aos dias de hoje, o fitoflagelado apelidado de *Euglena gracilis* é o único caso onde foi reportada a coexistência das duas vias [43].

2.2.2 - Porfobilinogénio

O próximo passo da biossíntese é definido pela condensação assimétrica de duas moléculas de δ -ALA por parte da enzima porfobilinogénio sintase (PBGS) ou também intitulada ácido 5-aminolevulínico desidratase (ALAD). Em mamíferos e fungos, esta enzima expressa pelo gene *hemB* necessita de zinco para ter atividade [44], em algumas bactérias precisa de magnésio [45, 46] e em *E. coli* contém zinco mas depende de magnésio no centro de ligação alostérico para estar ativa. Pelo contrário, a PBGS de *Rhodobacter capsulatus* não contém nenhum ião metálico [47].

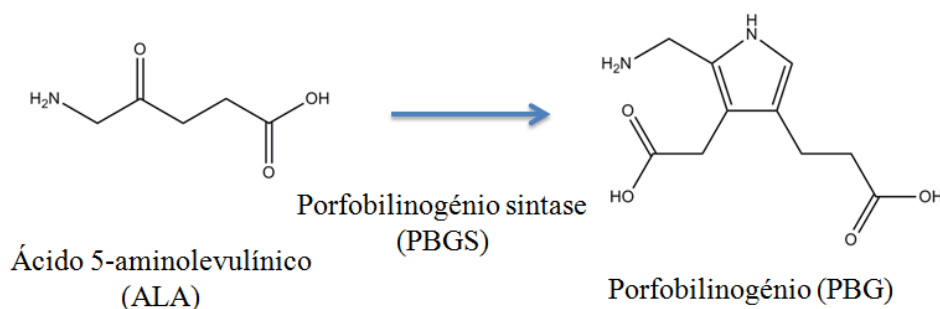


Figura 1.7 – Formação de porfobilinogénio a partir de ácido 5-aminolevulínico por ação da porfobilinogénio sintase.

A enzima contém dois locais de ligação: A e P que anexam, correspondentemente, os ácidos acético e propiónico das moléculas de δ -ALA. O primeiro passo da reação implica a formação de uma base de Schiff entre uma molécula de δ -ALA e uma lisina presente no local de ligação P. Em seguida liga-se a segunda molécula de δ -ALA ao local A dando origem ao grupo acetato do PBG que, por sua vez, origina uma enamina que sofre uma condensação aldólica com

a outra molécula de δ -ALA. Forma-se assim uma ligação C-C que é posteriormente convertida numa ligação C-N, após reagir com uma base de Schiff, formando, através da transferência de prótons, o produto aromático [48].

2.2.3 - Hidroximetilbilano

São necessárias quatro moléculas de PBG para se proceder à polimerização sequencial de um tetrapirrole linear e instável, o 1-hidroximetilbilano ou preuroporfirinogénio. Esta tetramerização é efetuada pela enzima porfobilinogénio desaminase (PBGD) através da remoção de quatro moléculas de amónia, durante este processo a cadeia de pirroles liga-se a um cofator intrínseco à mesma. Este tem origem em duas moléculas de PBG e forma um dipirrometano que funciona como iniciador e encontra-se covalentemente ligado à enzima - codificada pelo gene *hemC* - por uma ligação tioéter à cisteína da mesma [49]. Assim que os quatro pirroles se encontram enquadrados, quebra-se a conexão entre o cofator e o primeiro pirrole obtendo-se o produto final.

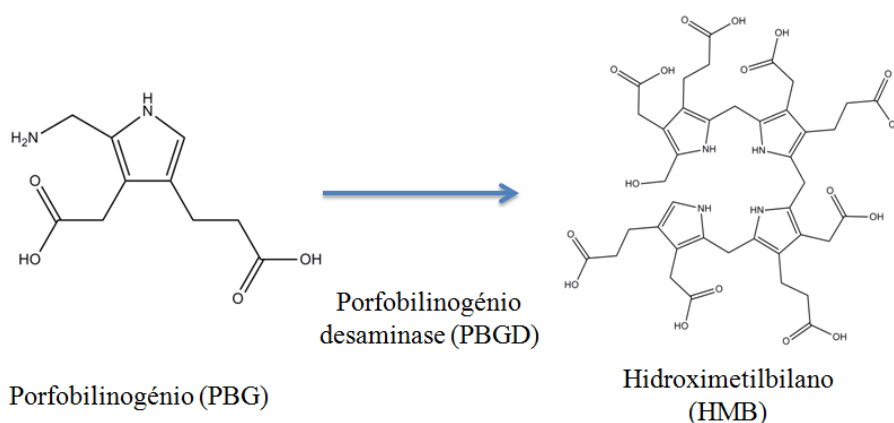


Figura 1.8 – Formação de hidroximetilbilano a partir de porfobilinogénio por ação da porfobilinogénio desaminase.

2.2.4 - Uroporfirinogénio III

Quando o intermediário hidroximetilbilano é formado, a enzima uroporfirinogénio sintase (UROS) codificada pelo gene *hemD*, catalisa a inversão do anel D e a ligação ao anel A, originando uma molécula macrocíclica denominada uroporfirinogénio III. A UROS é das enzimas que apresenta menor homologia entre diferentes organismos e quando não está presente, o hidroximetilbilano cicliza espontaneamente produzindo o isómero uroporfirinogénio I.

A partir deste ponto serão elucidadas algumas ramificações que definem que tetrapirrole é formado e quais as enzimas envolvidas na sua biossíntese.

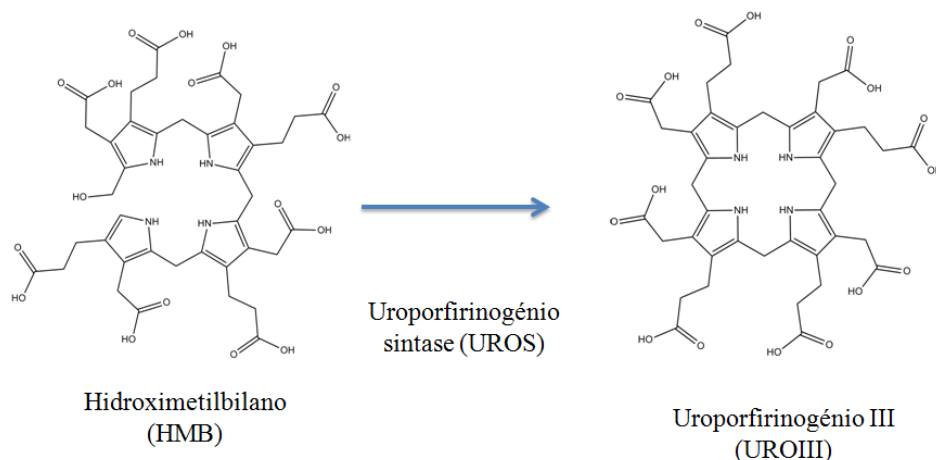


Figura 1.9 – Formação de uroporfirinogénio III a partir de hidroximetilbilano por ação da uroporfirinogénio sintase.

2.2.5 - Hemo

A biossíntese de hemo é uma via bastante conservada na maior parte dos organismos, este processo envolve quatro passos enzimáticos que tem início com a descarboxilação de quatro grupos acetato por ação da uroporfirinogénio III descarboxilase (UROD) cuja expressão depende do gene *hemE*. A ação da UROD origina grupos metilo nos locais descarboxilados e consequentemente, coproporfirinogénio III [50].

Esta molécula sofre uma descarboxilação oxidativa por parte de uma de duas enzimas, a coproporfirinogénio III oxidase (CPO) em condições aeróbias ou a coproporfirinogénio III desidrogenase (CPDH) na ausência de oxigénio. A primeira é codificada pelo gene *hemF* e a segunda é codificada pelo gene *hemN* ou em alguns casos pelo *hemZ*, dependendo do microrganismo [51]. Forma-se assim protoporfirinogénio IX com a conversão de dois propionatos em dois grupos vinil.

O protoporfirinogénio IX sofre uma oxidação por ação da protoporfirina IX oxidase (PPO) resultando num sistema macrocíclico conjugado intitulado protoporfirina IX. Tal como no passo anterior, também existem duas variações de PPO – dependente e independente de oxigénio – expressas pelos genes *hemG* ou *hemY*, enquanto a primeira utiliza oxigénio como aceitador final de eletrões, pensa-se que a segunda direciona os mesmos para outro aceitador típico da respiração anaeróbia, mas ainda pouco se sabe relativamente a esta via [52].

O último passo caracteriza-se pela inserção de ferro no macrociclo da protoporfirina IX, esta ação é realizada pela ferroquelatase (FC) cuja expressão depende do gene *hemH*, obtendo-se assim o grupo prostético hemo.

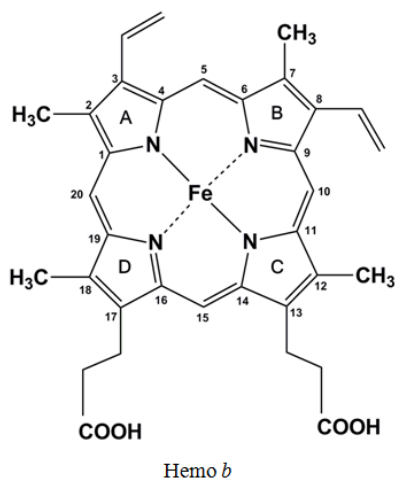


Figura 1.10 - Estrutura química do hemo *b*, um dos hemos mais comuns na natureza.

2.2.6 - Sirohemo e vitamina B₁₂

Em alternativa à descarboxilação de uroporfirinogénio III pela UROD, pode ocorrer a sua metilação por intermédio da uroporfirinogénio III metiltransferase (UROM), esta propriedade da enzima é dependente de S-adenosilmetionina (SAM), que funciona como dador de grupos metil nas posições 2 e 7, dando origem a precorrina-2.

Para a produção de sirohemo são utilizadas diferentes enzimas para um mesmo fim: nas bactérias Gram-negativas *Salmonella typhimurium* e *E.coli*, a enzima multifuncional CysG contém dois domínios catalíticos, CysG^a e CysG^b, onde o primeiro é responsável pela transmetilação de uroporfirinogénio III a precorrina-2, enquanto o segundo procede à desidrogenação dependente de NAD⁺, resultando em sirohidroclorina e na posterior quelação de ferro neste tetrapirrole [53]. No caso das leveduras, as enzimas Met1p e Met8p são capazes de formar precorrina-2 e sirohemo correspondentemente, e homologamente à CysG. Na bactéria Gram-positiva *Bacillus megaterium*, a metilação de uroporfirinogénio III a precorrina-2 é efetuada pela SirA, a consequente desidrogenação é catalisada pela SirC e a quelação de ferro depende da SirB [35].

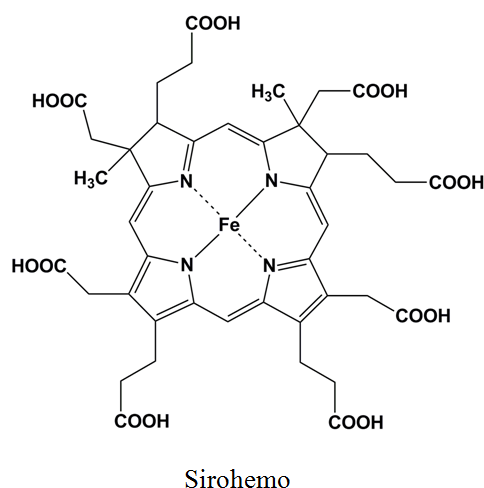


Figura 1.11 – Estrutura química do sirohemo.

Na biossíntese de vitamina B₁₂ em organismos aeróbios, ocorre metilação da precorrina-2 a precorrina-3A e esta via prossegue através de várias reações enzimáticas até à quelação de um átomo de cobalto na molécula de ácido hidrogenobírico a,c-diamida pela enzima CobN-S-T, enquanto em organismos anaeróbios esta quelação ocorre logo num passo inicial com a atividade de cobaltoquelatase de uma CbiK ou CbiX [37]. Esta enzima também utiliza sirohidroclorina como substrato e origina cobalto-sirohidroclorina [54] que segue a via anaeróbia alternativa até à formação do composto que volta a interetar as duas vias até à formação da vitamina B₁₂, o cobirinato a,c-diamina. Segundo a dependência ou independência de oxigénio, os microrganismos possuem enzimas com o prefixo cob e cbi correspondentemente, que indicam a que via pertencem, facilitando assim a sua identificação [37].

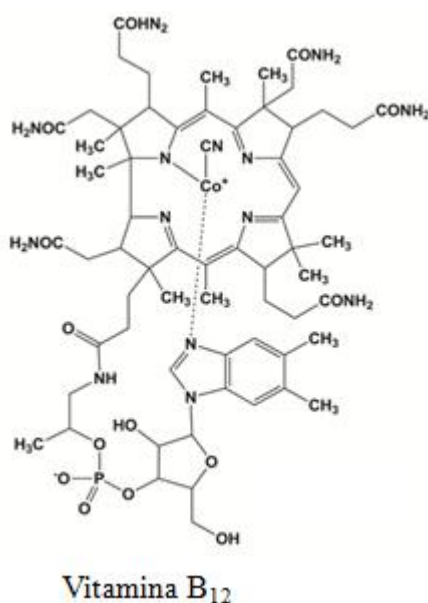


Figura 1.12 – Estrutura química da vitamina B₁₂.

2.3 - Biossíntese de tetrapirroles em *Desulfovibrio vulgaris* Hildenborough

A bactéria redutora de sulfato *Desulfovibrio vulgaris* Hildenborough é um dos microrganismos anaeróbios mais estudados e que em particular, possui um elevado número de proteínas que contêm vários tetrapirroles modificados. Assim, pode ser utilizada como organismo modelo para tentar perceber como é que estes organismos realizam a biossíntese de tetrapirroles.

Em *D.vulgaris*, e tal como na maior parte das bactérias, o ácido aminolevulínico tem origem na via de C₅ e a formação de porfobilinogénio depende da porfobilinogénio sintase (HemB), uma enzima homohexamérica que neste caso, necessita de zinco para proceder à condensação de duas moléculas de δ -ALA a PBG.

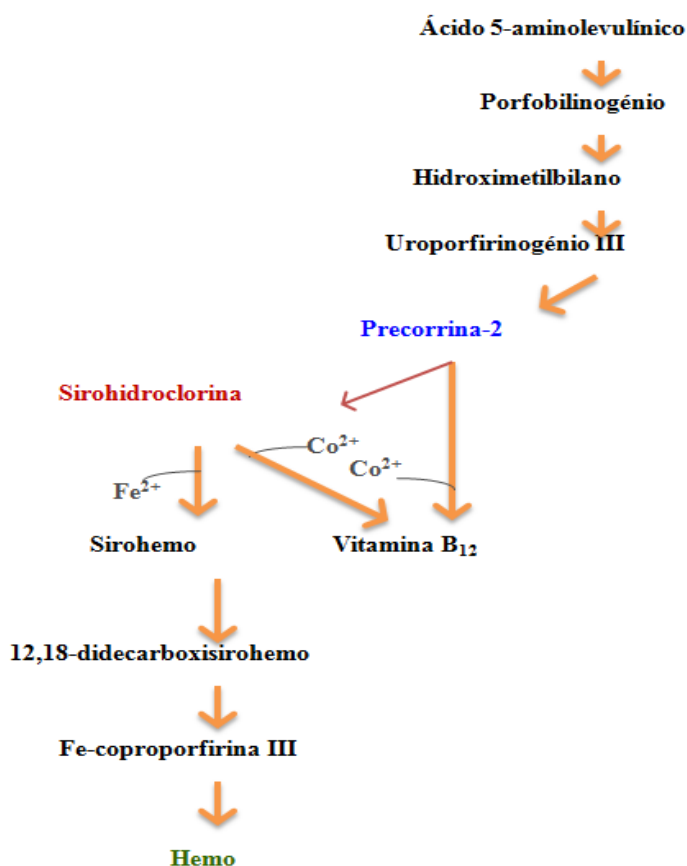


Figura 1.13 – Esquema que pretende elucidar a biossíntese de tetrapirroles em *Desulfovibrio vulgaris* Hildenborough

A desaminação do porfobilinogénio ocorre por parte da porfobilinogénio desaminase (HemC), que assim como em *E. coli*, possui um cofator dipirrometano que lhe permite originar

o tetrapirrole linear hidroximetilbilano [49, 55]. Uma das particularidades de *D.vulgaris* é a existência de uma proteína bifuncional codificada pelos genes *hemD* e *cobA* que se encontram fundidos. Esta enzima então denominada HemD-CobA possui a capacidade de uroporfirinogénio III sintase e metiltransferase dependente de SAM, possibilitando a rápida formação de precorrina-2 sem libertação de uroporfirinogénio III. A instabilidade da precorrina-2 faz com que esta seja desidrogenada por uma SirC que utiliza NAD⁺ como aceitador de eletrões, originando sirohidroclorina. Verifica-se que em *Desulfovibrio vulgaris*, a síntese de hemo não ocorre pela via biossintética clássica visto que não contém as enzimas necessárias a esse processo, tais como as HemE, N, G e H. Ainda assim, um facto interessante é a constatação da existência de várias proteínas utilizadas na biossíntese de hemo d₁ (NirD; H ; J-1 e J-2) apesar de *Desulfovibrio* aparentemente não possuir este cofator, o que está de acordo com um caminho alternativo para originar hemo nesta bactéria redutora de sulfato [55].

Intermediários numa forma descarboxilada de sirohidroclorina (12-18-didecarboxisirohidroclorina e monocarboxisirohemo, 12-18-didecarboxisirohemo), assim como, Fe-coproporfirina III e hemo *b* foram obtidos por incubação anaeróbia de lisados de *D.vulgaris* com sirohemo e permitem comparar esta via alternativa às já estudadas em bactérias desnitrificantes e em archaea [56, 57] onde a biossíntese de hemo *b* é executada após dois passos de descarboxilação consecutivos dependentes de SAM. As duas primeiras descarboxilações incidem nos carbonos 12 e 18 do sirohemo catalisadas por AhbA e AhbB (*alternative heme biosynthetic* - NirD e NirH assim renomeadas devido ao novo caminho biossintético) originando 12-18-didecarboxisirohemo, que, por sua vez, gera Fe-coproporfirina III após remoção dos ácidos acéticos nas posições C2 e C7 pela enzima AhbC. No último passo da biossíntese alternativa de hemo, a AhbD (NirJ-2) catalisa a conversão dos dois grupos propionato dos carbonos 3 e 8 em grupos vinil formando enfim hemo *b* a partir de sirohemo. Tais estudos demonstram que a biossíntese de sirohemo não está apenas confinada à produção deste cofator mas também funcionará como intermediário na biossíntese de hemo *b* [36].

Em *D.vulgaris*, a enzima CbiK^C (citoplasmática) demonstra capacidade de inserir cobalto na sirohidroclorina, formando cobalto-sirohidroclorina num dos primeiros passos da biossíntese de vitamina B12 [58].

3 - As quelatases em bactérias

3.1 – Classificação

A biossíntese de tetrapirroles depende estritamente de um passo onde estas moléculas sofrem desprotonação nos dois azotos pirrólicos e inserem um íon metálico definindo qual o macrociclo formado. A possibilidade de produzir diferentes compostos obriga a que em cada ramificação exista uma enzima responsável pela introdução do metal adequado no tetrapirrole, ou seja, uma quelatase (Figura 1.14).

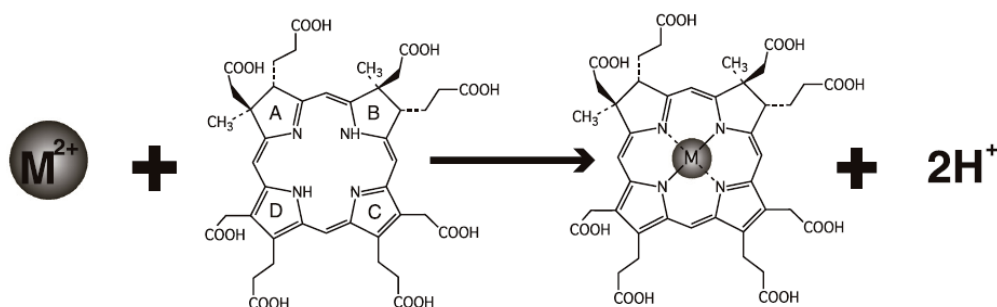


Figura 1.14 – Reação catalisada por uma quelatase. O metal é inserido e são removidos dois prótons do tetrapirrole [58].

Existem três tipos de quelatases que variam consoante as suas necessidades energéticas e tamanho. As do tipo I dependem de três subunidades e de ATP para realizar a sua atividade, alguns exemplos são a magnésioquelatase (ChlH-I-D) envolvida na síntese de clorofila e a cobaltoquelatase (CobN-S-T) responsável pela inserção de cobalto na via aeróbia de formação de vitamina B_{12} .

As quelatases do tipo II são normalmente monómeros ou homodímeros e não requerem ATP, as mais comuns são a protoporfirina ferroquelatase (HemH), a sirohidroclorina ferroquelatase (SirB) e as sirohidroclorinas cobaltoquelatases (CbiX, CbiK).

O tipo III engloba as quelatases envolvidas na biossíntese de sirohemo que, tal como as do tipo II, são geralmente homodímeros independentes de ATP e incluem as enzimas multifuncionais Met8p e a CysG de *E. coli* [59].

3.1.1 – Propriedades das quelatases do tipo II

Estudos mais recentes apontam para que estas enzimas tenham tido origem a partir da mais simples das quelatases, a CbiX^S. Esta proteína foi encontrada em *Archaeoglobus fulgidus*, *Methanobacter thermoautotrophicum* e *Methanosarcina bakeri* [59, 60] onde recebeu o desígnio de S (“small”) pois continham apenas 130 aminoácidos, por ser pequena em relação a outras CbiX^L (“large”), como a de *Bacillus megaterium*. Geralmente, as quelatases das bactérias têm o dobro do tamanho das do domínio Archaea e isso deve-se provavelmente a eventos de fusão e duplicação génica.

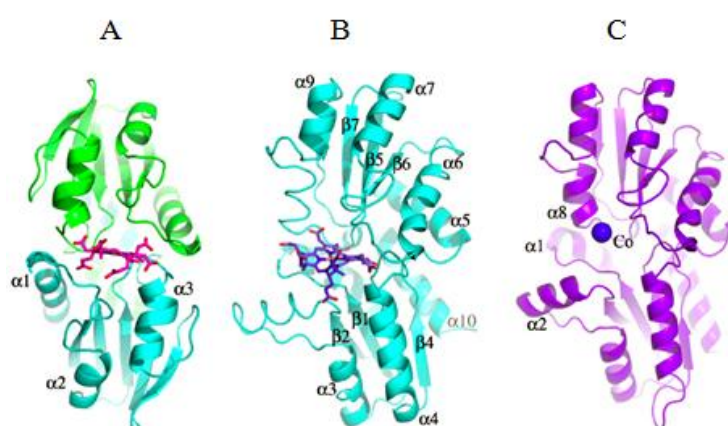


Figura 1.15 – Estruturas cristalográficas de três CbiK/X. Representação da CbiX^S de *Archaeoglobus fulgidus* (A) e da CbiK de *Salmonella enterica* (B) ligadas a sirohidroclorina. A estrutura C corresponde à CbiK^P de *Desulfovibrio vulgaris* Hildenborough com cobalto ligado no centro ativo [58].

Foi demonstrado que estas enzimas são capazes de inserir cobalto *in vitro* em tetrapirroles modificados na produção de cobalamina, enquanto as CbiK e HemH de *Salmonella enterica* e *Bacillus subtilis* também realizam esse passo com ferro para originar sirohemo, dependendo da sua zona catalítica presente no C-terminal. Já as CbiX^L e SirB de *Bacillus megaterium* possuem os seus resíduos do centro ativo no domínio N-terminal [58].

3.2 - As duas cobaltoquelatases de *Desulfovibrio vulgaris* Hildenborough

A bactéria Gram-negativa, *Desulfovibrio vulgaris* Hildenborough possui duas cobaltoquelatases apelidadas de CbiK^C e CbiK^P (assim denominadas devido à sua presença no

citoplasma e no periplasma), em que ambas demonstraram ter a capacidade de inserir cobalto e ferro *in vitro*, com maior afinidade para o cobalto, formando cobalto-sirohidroclorina e sirohemo, correspondentemente. Estão também aptas a quelatar ferro *in vivo* por complementação de uma estirpe mutante de *E. coli* capaz de produzir sirohidroclorina, mas incapaz de produzir sirohemo [61].

Estas duas enzimas têm 39% de homologia entre aminoácidos mas algumas características são completamente distintas e permitem-nos tentar perceber qual a sua importância. Primeiramente, a CbiK^P apresenta uma forma tetramérica e contém um hemo *b* por cada dímero (Figura 1.16) que lhe confere uma cor alaranjada. Ainda que a CbiK^P de *Porphyrimonas gingivalis* contenha na sequência de aminoácidos um potencial local de ligação a hemo [62], a presença de um hemo *b* na estrutura da CbiK^P é um caso único entre as quelatases.

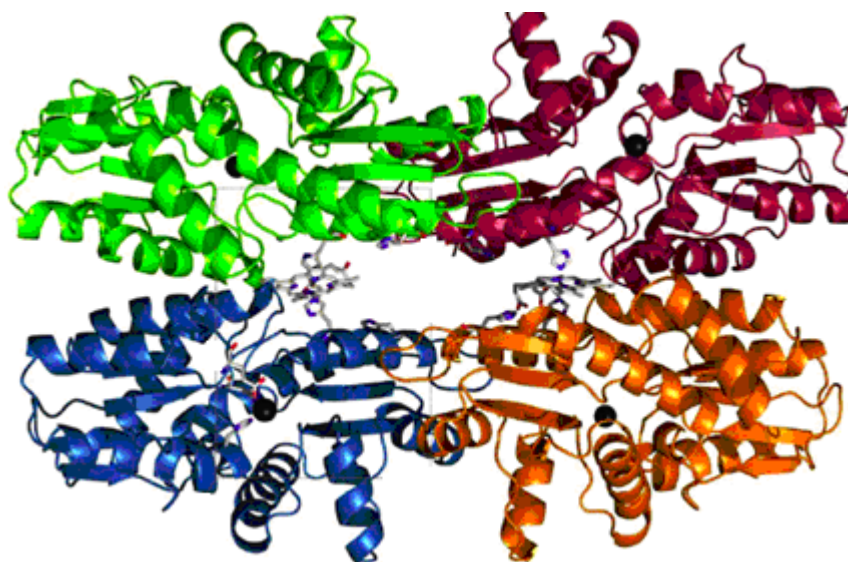


Figura 1.16 – Estrutura cristalográfica da CbiK^P de *Desulfovibrio vulgaris* Hildenborough. As cores diferentes indicam cada monómero, enquanto os hemos *b* estão entre cada dímero e o local de ligação ao cobalto está representado com bolas negras [58].

Esta CbiK^P contém um sinal peptídico que implica o transporte para o periplasma. No entanto, a forma truncada da proteína sem os primeiros 28 aminoácidos que lhe retiram essa particularidade, assim como o grupo hemo, têm atividade similar, o que indica que o hemo não terá qualquer papel na inserção de metal. Tal ideia foi corroborada após análise da estrutura da proteína e constatação do afastamento entre as posições dos grupos hemo (H96) e dos locais de ligação ao metal que apresentam, para além do E184, duas histidinas conservadas (H154 e H216, Figura 1.17) [58].

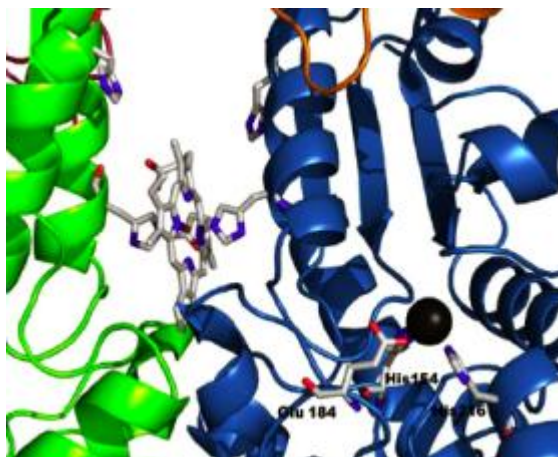


Figura 1.17 – Perspetiva detalhada da cavidade central da CbiK^P com ênfase no hemo *b* e nos resíduos que ligam ao cobalto (a negro) [58].

A cristalização da CbiK^P com cobalto demonstra que o anel do imidazole da His154 sofre uma rotação de 63° em relação à apo-proteína, apontando para uma alteração conformacional dependente do substrato. Além dos aminoácidos referidos, também foi possível identificar a importância do R54, E76 e H103, propostos estarem envolvidos na manutenção da estrutura quaternária da proteína.

As duas CbiK apresentam uma homologia de 30% quando comparadas com as estruturas primárias das CbiK de *Salmonella enterica* e de *Porphyrimonas gingivalis* e uma elevada identidade a nível da topologia com outras quelatases, como é o caso da HemH de *Bacillus subtilis*, a CbiK^S de *Archaeoglobus fulgidus* e a CbiK de *Salmonella enterica*. A CbiK^C parece ter um papel preponderante na produção de cobalamina, enquanto a CbiK^P poderá estar envolvida no transporte de ferro ou hemo, visto que a biossíntese de vitamina B₁₂ é citoplasmática e não se coaduna com esta localização [37].

Este trabalho pretendeu: i) avaliar a função de resíduos de aminoácidos da CbiK^P de *D. vulgaris* Hildenborough que estão propostos estarem envolvidos na inserção de metais na sirohidroclorina, na oligomerização da proteína e na ligação de grupos hémicos e ii) determinar a localização celular da CbiK^P em *D. vulgaris*. Todos os aminoácidos relevantes foram substituídos por leucinas, através da técnica de mutagénese dirigida. A leucina é um dos aminoácidos mais pequenos e com esta substituição tentou-se evitar a adoção de uma nova conformação da proteína ou qualquer outro efeito com base no tamanho do aminoácido substituinte.

Capítulo II - Materiais e métodos

Nesta dissertação realizou-se a expressão, purificação e caracterização bioquímica da CbiK^P selvagem e das 7 proteínas mutadas: R54L-CbiK^P, E76L-CbiK^P, H96L-CbiK^P, H103-CbiK^P, H154L-CbiK^P, E184L-CbiK^P, H216-CbiK^P; a construção de 2 mutantes dirigidos duplos de CbiK^P, a complementação *in vivo* em *E. coli* 302Δa mutada na Δ*cysG* e tentou-se elaborar um protocolo de fracionamento dos componentes celulares de *Desulfovibrio vulgaris* Hildenborough, tendo em vista localização celular da CbiK^P nativa, recorrendo a técnicas de bioquímica, biologia molecular e engenharia genética.

2.1 - Expressão das proteínas recombinantes

Os genes resultantes das mutações dirigidas de CbiK^P de *Desulfovibrio vulgaris* Hildenborough clonados em pET-28a (+) (Novagen), foram previamente construídos (sem cauda de histidinas) e sequenciados a partir do gene *DVU0650*.

Com o objetivo de obter as proteínas mutadas e selvagem, todos os plasmídeos recombinantes contendo o gene *DVU0650* foram transformados por choque térmico (Capítulo 2.7.1), a 42 °C durante 20 segundos, em células de expressão de *Escherichia coli* BL21Gold (DE3) da Stratagene. As células transformantes foram selecionadas em meio LA (Luria Agar) e canamicina (30 µg/mL).

Após incubação durante a noite a 37 °C, as colónias obtidas foram repicadas para meio LB (Luria Bertani) com canamicina (30 µg/mL) e incubadas com agitação a 180 rpm e a uma temperatura de 37 °C. No dia seguinte, inoculou-se 1% de 3 L de LB (distribuídos por 3 erlenmeyers de 2 L e com canamicina a 30 µg/ml) com o pré-inóculo realizado no dia anterior. O crescimento ocorreu a 30 °C, 150 rpm e a densidade óptica foi seguida a 600 nm num espectrofotómetro UV/Visível DU-70 da Beckman. Quando a densidade óptica atingiu 0,3, induziu-se a expressão das proteínas com 200 µM de IPTG (isopropil-β-D-tiogalactosídeo), tendo sido suplementado com 50 µM de ácido 5-aminolevulínico e 100 µM de FeSO₄. A cultura ficou a agitar a 120 rpm e a 20 °C durante a noite (~ 8 horas) [61].

2.2 - Purificação das proteínas

As células foram recolhidas por centrifugação a 14160 x g durante 10 minutos utilizando o rotor JA-10 das centrífugas Avanti J-25I ou J-26 XPI da Beckman Coulters. De seguida, as células foram ressuspensas em tampão Tris-HCl 50 mM, pH 8 num volume de 15/20 mL e lisadas 3 vezes numa *french press* da Thermo Electron Corporation (a 1000 psi).

Centrifugaram-se as células a 45360 x g (com o rotor JA 25.5 durante 30 minutos), onde o *pellet* formado engloba corpos de inclusão e células não partidas. O sobrenadante originado foi ultracentrifugado ao longo de 2 horas a 228060 x g numa TL 100 da Beckman, com a finalidade de separar a fração solúvel das membranas. Todos os passos de centrifugação foram realizados a 4 °C.

O primeiro passo de purificação teve início com a aplicação da cromatografia de afinidade por iões metálicos imobilizados numa coluna IMAC Sepharose *High Performance*, utilizando os sistemas de purificação ÄKTA prime plus e ÄKTA purifier da GE Healthcare. A resina de 25 mL foi previamente carregada com uma solução de $\text{NiSO}_4(\text{H}_2\text{O})_6$ e equilibrada com 5 volumes de tampão A - Tris-HCl 20 mM, pH 8 e 400 mM de NaCl. Utilizou-se o gradiente descrito na tabela 2.1 a um fluxo de 2,5 mL/min e um tampão B constituído por Tris-HCl 20 mM (pH 8), 400 mM de NaCl e 250 mM de imidazole.

Tabela 2.1 - Programa de purificação utilizado na IMAC Sepharose HP de 25 mL. O fluxo de corrida adotado foi de 2,5 mL/min.

Volumes de coluna (1 vol = 25 mL)	% de tampão B
2	0
3	0 - 5
5	5 - 10
5	10 - 15
5	15 - 30
2	30 - 100
2	100

A purificação das proteínas foi seguida por UV/visível a 280 nm – proteína e 410 nm – (hemo, banda de Soret) devido à presença de hemo *b*. Todas as proteínas foram eluídas com cerca de 20 mM de imidazole e separadas em diferentes *pools* após visualização em gel de SDS-PAGE de 12,5% (Capítulo 2.7.2) e consoante o seu grau de purificação. Estas frações foram dialisadas contra 3 L de tampão Tris-HCl 50 mM (pH 8) durante a noite, de forma a remover o NaCl e imidazole. Posto isto, as frações são concentradas com o auxílio de uma célula de ultrafiltração da Amicon e são depositadas em gel de SDS-PAGE para avaliação da pureza.

Na etapa seguinte, procede-se à injeção da fração selecionada numa coluna Q-Sepharose *High Performance* de 25 mL (GE Healthcare), após passagem de 2 volumes de tampão A (Tris-HCl 20 mM, pH 8). O gradiente utilizado está descrito na tabela 2.2, onde o tampão B contém Tris-HCl 20 mM e NaCl 1 M (pH 8) e o fluxo da corrida foi de 2,5 mL/min.

Tabela 2.2 - Programa de purificação utilizado na Q-Sepharose HP de 25 mL. O fluxo de corrida adotado foi de 2,5 mL/min.

Volumes de coluna (1 vol= 25 mL)	% de tampão B
2	0
3	0 - 15
4	15 - 25
3	25 - 50
2	50 - 100
2	100

Seguiram-se os comprimentos de onda anteriormente referidos e no final, as proteínas foram eluídas com cerca de 300/350 mM de NaCl e agrupadas em frações, procedendo-se da mesma forma que enunciado anteriormente, recorrendo à diálise e consequente concentração.

As frações solúveis das várias proteínas foram centrifugadas (15 minutos a 45360 x g em JA 25.5) antes de serem injetadas nas colunas e a fim de evitar a precipitação de contaminantes na coluna, assim como todos os tampões foram previamente filtrados e desarejados sob vácuo. Terminada a utilização das colunas, estas foram mantidas em etanol 20%.

Após averiguação do estado de pureza das proteínas por SDS-PAGE, as que se apresentavam puras estavam prontas para caracterização, enquanto outras necessitaram de repetir a passagem pela coluna Q-Sepharose HP. Assim sucedeu com a CbiK^P selvagem e os mutantes H96L, H103L, H154L e H216L.

2.3 - Caracterização bioquímica

As proteínas foram quantificadas pelo método do ácido bicinonínico (BCA) da Pierce (Capítulo 2.7.3) e a leitura da absorvância a 562 nm foi realizada num leitor de placas Multiskan

Go, da Thermoscientific. Realizou-se a quantificação de grupos hémicos pelo método do piridina hemocromo (Capítulo 2.7.4) [63] e obtiveram-se os espectros oxidado e reduzido num espectrofotómetro UV/visível (UV-1700 Pharmaspec) da Shimadzu.

A massa molecular e estrutura quaternária das proteínas foram avaliadas por filtração em gel numa coluna Superdex 200 analítica (Ge Healthcare) com um fluxo de corrida de 0,5 mL/min. Procedeu-se primeiramente à passagem de azul de dextrano para conhecer o volume morto da coluna e, de seguida, passaram-se várias proteínas com massa molecular conhecida (Tabela 2.3) para elaborar uma reta de calibração com base no seu tempo de retenção.

Tabela 2.3 - Padrões utilizados na construção da reta de calibração para avaliar a estrutura quaternária das proteínas analisadas.

Padrões	Massa molecular aproximada (kDa)
Azul de dextrano	15
Hemoglobina bovina (Sigma)	65
Albumina de soro bovina (Sigma)	67
Citocromo C de cavalo (Sigma)	12
Gama-Globulina humana (Sigma)	160
Albumina de soro humana (Sigma)	67

Todas as amostras foram previamente centrifugadas (15 minutos a 16831 x g), numa centrífuga 3K15 (rotor Nr. 12154-H) da Sigma e injetados 100 µL na coluna a 0,1 ml/min, utilizando um *loop* com o mesmo volume. Os espectros foram tratados e analisados com o apoio do *software* UV Probe da Shimadzu.

Foi testada a atividade de cobaltoquelatase e ferroquelatase da proteína CbiK^P selvagem e respetivos mutantes, utilizando sirohidroclorina como substrato enzimático. Assim, o plasmídeo pETcoco2ABCD - que contém os genes que codificam para a uroporfirinogénio III metiltransferase de *Methanosarcina barkeri* (CobA), porfobilinogénio sintase (HemB) e

precorrina-2-desidrogenase (SirC) de *Methanothermobacter thermoautotrophics*, porfobilinogénio desaminase (HemC) e uroporfirinogénio III sintase (HemD) de *Bacillus megaterium* – foi transformado para as células competentes de *E. coli* BL21 (DE3) pLysS da Stratagene por choque térmico a 42 °C durante 20 segundos e plaqueado em meio LA com ampicilina (50 µg/mL), cloranfenicol (35 µg/mL) e 0,2 % (w/v) de glucose. O crescimento ocorreu a 37 °C, 150 rpm, e utilizou-se um pré-inóculo preparado no dia anterior com os mesmos antibióticos. Inoculou-se 1% de 2 L de LB, seguindo a densidade óptica a 600 nm até 0,5. Neste ponto induziu-se a expressão com 400 µM de IPTG e suplementou-se com 0,02 % (p/v) de L-arabinose. Após indução, o crescimento ficou a 20 °C durante a noite e as células foram recolhidas no dia seguinte, sucedendo-se a lise pela *french press* e a centrifugação para separar as células não partidas, como descrito anteriormente.

O lisado foi transferido para a câmara anaeróbia e 2 mL foram incubados durante a noite com 2 mg de S-adenosilmetionina, 2 mg de ALA e 1 mg de NAD⁺ num volume total de 6 mL, completo com tampão Tris-HCl 50 mM (pH 8), acertando o pH a 8 com KOH 1 M. No dia seguinte passou-se a sirohidroclorina formada num filtro de 0,22 µm e numa resina DEAE de 4mL (Sigma), previamente equilibrada com Tris-HCl 50 mM (pH 8) para proceder à sua purificação. Utilizou-se um gradiente em escada com cerca de 4 volumes em cada patamar, onde o tampão indicado contém concentrações crescentes de NaCl para eluir o substrato: 100 mM, 250 mM e 1 M. A sirohidroclorina foi eluída com 1 M de NaCl e traçou-se o seu espectro num espectrofotómetro UV/visível (UV-1800 Pharmaspec) da Shimadzu, onde o tampão Tris-HCl 50 mM (pH 8) foi usado como branco.

A atividade enzimática é avaliada seguindo o desaparecimento da absorvância a 376 nm [54] e avaliando o coeficiente de extinção molar ao mesmo comprimento de onda ($2,4 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). Todos os ensaios foram realizados, em triplicado, numa cuvete com um volume de reação de 1 mL e iniciados com a adição de tampão Tris-HCl 50 mM a pH 8 e 4,2 µM de sirohidroclorina numa cuvete de quartzo. Após estabilização na leitura da absorvância, adiciona-se 20 µM de cobalto ou ferro (consoante o ensaio) e por último, a proteína a ser testada.

Entre ensaios, lavou-se a cuvete com tampão Tris-HCl 50 mM com 50 mM de EDTA (Ácido etilenodiamino tetra-acético) a pH 8, para quelatar os metais e não influenciar outros testes e, por fim, passou-se abundantemente com água. Descontou-se a atividade química relativa à adição do metal ao valor da atividade enzimática, obtendo-se assim, a atividade real da proteína. Calculou-se a média dos 3 ensaios e dividiu-se o número de moles de proteína pelas mg usadas no ensaio, o valor de atividade é dado em $\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$.

As atividades foram realizadas numa câmara anaeróbia modelo A-2463 da Coy Laboratory Products, purgada com uma mistura gasosa de 95 % de árgon e 5 % de hidrogénio, e todas as soluções e reagentes utilizados foram previamente desarejados com árgon.

2.4 - Complementação da estirpe $\Delta cysG$ de *E. coli* pelos mutantes dirigidos de CbiK^P

Os genes mutados em pET-28a (+) têm 894 bp e foram amplificados por PCR (*Polymerase chain reaction*) num termociclador Mycycler da Biorad. As reações foram preparadas num volume total de 50 μ L com as concentrações apresentadas na tabela 2.4 e colocadas no termociclador, onde a amplificação se iniciou com 3 minutos de desnaturação a 95 °C. Seguiram-se 40 ciclos que englobam 1 minuto de desnaturação a 94 °C, 1 minuto de emparelhamento a 56 °C e 1 minuto de extensão a 72 °C. No final, ocorreu uma extensão durante 10 minutos a 72 °C.

Tabela 2.4 – Concentração final, por reação, dos componentes utilizados na amplificação dos genes resultantes das mutações dirigidas de CbiK^P.

Componentes	Concentração final
<i>Template</i>	20 ng
Vent DNA polimerase	0,8 U
<i>Primer forward</i> (Anexo 1)	1 μ M
<i>Primer reverse</i> (Anexo 1)	1 μ M
dNTPs	200 μ M
Tampão de reação thermopol	20 mM Tris-HCl + 10 mM (NH ₄) ₂ SO ₄ + 10 mM KCl + 2 mM MgSO ₄ + 0.1 % Triton X-100 (pH 8)

Terminada a reação de PCR, a pureza do produto foi avaliada por electroforese em gel de agarose 1 % (p/v), como descrito no capítulo 2.7.5. Os produtos foram novamente colocados em gel de agarose e após corrida, são extraídos do gel com o auxílio do *QIAquick gel extraction kit* da Qiagen. Posto isto, quantificou-se em duplicado o DNA amplificado no Nanodrop 2000c *spectrophotometer* da Thermoscientific. O DNA foi digerido com Nde I / Hind III (Tabela 2.5)

para posteriormente o clonar no plasmídeo pETac, um pET14b modificado onde o promotor do T7 foi substituído por um promotor Ptac.

Tabela 2.5 - Concentração dos componentes utilizados na digestão dos 7 mutantes dirigidos de CbiK^P.

Componentes	Concentração final
Mutante dirigido de CbiK^P- pET28 a (+) amplificado	350 ng
Nde I	40 U
Hind III	40 U
Tampão NEB 2	10 mM Tris-HCl + 50 mM NaCl + 10 mM MgCl ₂ + 1 mM ditiotritol - pH 7,9 a 25 °C

A digestão ocorreu durante 2,5 horas a 37 °C e de seguida, utilizou-se o *QIAquick PCR purification kit* da Qiagen para limpar o fragmento de DNA digerido. Este foi novamente quantificado e analisado em gel de agarose 1 % para avaliar a qualidade da digestão.

A partir de um *stock* do plasmídeo pETac, preparou-se um pré-inóculo que ficou a crescer a 37 °C, 150 rpm com 100 µg/mL de ampicilina. No dia seguinte, o plasmídeo foi isolado com o *QIAprep spin miniprep kit* da Qiagen, analisado em gel de agarose 1 %, quantificado e digerido (Tabela 2.6) tal como os fragmentos de DNA dos genes mutados que foram previamente amplificados.

Tabela 2.6 - Concentração dos componentes utilizados na digestão do plasmídeo pETac.

Componentes	Concentração final
pETac	2,5 µg
Nde I	60 U
Hind III	60 U
Tampão NEB 2	10 mM Tris-HCl + 50 mM NaCl + 10 mM MgCl ₂ + 1 mM ditiotritol - pH 7,9 a 25 °C

O DNA digerido foi isolado num gel de agarose de 1 % e extraído do mesmo com o *gel extraction kit* da Qiagen e quantificado. Foram utilizadas cerca de 250 ng de cada fragmento de DNA digerido para ligar a 80 ng de pETac num volume total de 10 µL com 3 U da enzima T4

DNA ligase da Promega. O tampão de reação usado contém 30 mM de Tris-HCl (pH 7,8), 10 mM MgCl₂, 10 mM DTT (ditiotreitól) e 1 mM ATP e foi previamente vortexado para que o precipitado se dissolva e não prejudique o rendimento da reação. As clonagens foram realizadas durante 4 horas à temperatura ambiente e transformadas por choque térmico a 42 °C durante 45 segundos para as células competentes de *E. coli* XL1-Blue (Agilent).

A placa com meio LA e 100 µg/mL de ampicilina ficou a 37 °C durante a noite, onde algumas das colónias formadas são possíveis clones positivos. Para avaliar se a clonagem foi conseguida realizou-se um PCR de colónias. Para tal, selecionaram-se algumas colónias retirando um pouco de massa celular que foi ressuspensa em 50 µL de água Mili-Q esterilizada, e as amostras fervidas durante 5 minutos. De seguida as amostras foram centrifugadas 1 minuto a 11586 x g e retirou-se 15 µL do sobrenadante para um tubo de PCR com os componentes descritos na tabela 2.7.

Tabela 2.7 - Concentração dos componentes utilizados nos PCR de colónias referidos.

Componentes	Concentração final
Taq DNA polimerase	1 U
<i>Primer forward</i> (Anexo 1)	0,5 µM
<i>Primer reverse</i> (Anexo 1)	0,5 µM
dNTPs	200 µM
Tampão de reação thermopol	20 mM Tris-HCl + 10 mM (NH ₄) ₂ SO ₄ + 10 mM KCl + 2 mM MgSO ₄ + 0.1 % Triton X-100 (pH 8)

As reações de PCR foram iniciadas com 1 minuto de desnaturação a 95 °C, seguidos de 30 ciclos que abrangem 30 segundos de desnaturação a 95 °C, 1 minuto de emparelhamento a 56 °C e 1 minuto de extensão a 68 °C. A extensão final a 68 °C tem a duração de 5 minutos.

Depois de analisado o produto de PCR em gel de agarose 1 % e de confirmada a amplificação, deixou-se a crescer as células em meio LB (com 100 µg/mL de ampicilina) o plasmídeo que seria isolado com *QIAprep spin miniprep kit* da Qiagen. Após análise em gel de agarose e quantificação, digeriu-se novamente durante 2,5 horas a 37 °C o fragmento de DNA clonado num volume de 10 µL (Tabela 2.8) para confirmar se a clonagem teve sucesso.

Tabela 2.8 - Concentração dos componentes utilizados na digestão do DNA dos mutantes dirigidos de CbiK^P clonados no plasmídeo pETac.

Componentes	Concentração final
pETac	2,5 µg
Nde I	10 U
Hind III	10 U
Tampão NEB 2	10 mM Tris-HCl + 50 mM NaCl + 10 mM MgCl ₂ + 1 mM ditioneitol - pH 7,9 a 25 °C

Confirmadas as clonagens, foi necessário induzir competência à estirpe de *E. coli* 302Δa pelo método do TB [64] (Capítulo 2.7.6) e transformar o plasmídeo pCIQ-*sirCcobA* por choque térmico a 42 °C durante 45 segundos. Este plasmídeo contém os genes *sirC* de *Methanobacterium thermoautotrophicus* e *cobA* de *Paracoccus denitrificans* necessários à produção de sirohidroclorina mas incapaz de produzir sirohemo. Após crescimento durante a noite a 37 °C em placa com meio LA e 35 µg/mL de cloranfenicol, fez-se um novo pré-inóculo para no dia seguinte induzir competência a *E. coli* 302Δa-pCIQ-*sirCcobA* pelo método do TB. Todos os mutantes foram transformados para estas células por choque térmico a 42 °C durante 45 segundos e selecionados em placa com meio LA, 35 µg/mL de cloranfenicol e 100 µg/mL de ampicilina.

Os ensaios de complementação foram realizados em placas com meio mínimo M9 (Tabela 2.9) com e sem cisteína para obter controlos positivo e negativo ao ensaio.

Tabela 2.9 - Composição do meio mínimo M9 utilizado nos ensaios de complementação.

Componentes	Concentração final
Meio mineral M9	13 g/L Na ₂ HPO ₄ .7H ₂ O + 5 g/L KH ₂ PO ₄ + 0,5 g/L NaCl + 1 g/L NH ₄ Cl
Bacto Agar	1,5 %
Glucose	0,4 %
MgSO₄	2mM
CaCl₂	0,1 mM
Ampicilina	100 µg/mL
Cloranfenicol	35 µg/mL
L-cisteína	5 mg/mL

Raspou-se um pouco de massa celular das placas de Petri com os mutantes dirigidos de CbiK^P inseridos em *E. coli* 302Δa-pCIQ-*sirCcobA* para ressuspender num eppendorf com tampão PBS (*phosphate buffered saline*) e ler a densidade óptica a 600 nm num espectrofotómetro UV-Visível (UV-1700 Pharmaspec) da Shimadzu. Utilizou-se tampão PBS como branco e após leitura, acertou-se a DO de todos ao mesmo valor para de seguida, fazer diluições de 10⁰, 10¹, 10² e 10³ em PBS e colocar 5 µL de cada diluição de cada mutante dirigido de CbiK^P nas placas de meio mínimo M9 com e sem cisteína. Realizou-se ainda um controlo negativo onde se plaqueou em meio mínimo apenas a estirpe de *E. coli* 302Δa com o plasmídeo pCIQ-*sirCcobA*. As placas incubaram durante a noite a 37 °C.

2.5 - Construção de mutações duplas de CbiK^P

Para obter mutações em mais do que um aminoácido na mesma proteína, utilizou-se o *QuickChange site-directed mutagenesis kit* da Stratagene. Este *kit* é empregue para obter mutações pontuais, trocar aminoácidos e deletar ou inserir um ou mais aminoácidos. De uma forma geral, utiliza-se um vector de DNA de cadeia dupla superenrolado com o *insert* desejado e dois *primers* sintetizados com a mutação desejada. Após incorporação destes *primers*, o plasmídeo mutado contém cortes e é digerido pela endonuclease Dpn I e posteriormente sofre uma transformação bacteriana para reparar os cortes no plasmídeo mutado.

Os resultados da complementação da estirpe $\Delta cysG$ de *E. coli* pelos mutantes dirigidos de CbiK^P sugeriram que se realizassem mutações em mais do que um dos aminoácidos propostos como importantes na ligação ao metal durante a sua atividade enzimática. Assim sendo, construíram-se as mutações H154L/H216L-CbiK^P e E184L/H216L-CbiK^P, sendo ainda necessário realizar as mutações H154L/E184L-CbiK^P e H154L/E184L/H216L-CbiK^P. As mutações tiveram início com uma reação de PCR (Tabela 2.10) com uma desnaturação inicial de 30 segundos a 95 °C e 16 ciclos que englobam 30 segundos de desnaturação a 95 °C, 1 minuto de emparelhamento a 55 °C e uma extensão a 68 °C durante 6 minutos e 23 segundos.

Tabela 2.10 - Concentração dos componentes utilizados nas mutações duplas dirigidas de CbiK^P.

Componentes	Concentração final
PfuTurbo DNA polimerase	2,5 U
Primer forward (Anexo 5)	0,25 µM
Primer reverse (Anexo 5)	0,25 µM
dNTPs	200 µM
Tampão de reação thermopol	20 mM Tris-HCl + 10 mM (NH ₄) ₂ SO ₄ + 10 mM KCl + 2 mM MgSO ₄ + 0.1 % Triton X-100 + 0,1 mg/mL BSA (pH 8,8)

Ao findar a reação de PCR adicionou-se 1 µL (10 U) da enzima de restrição Dpn I, efetuou-se um spin e a digestão ocorreu durante 1 hora a 37 °C. Assim que esta terminou, a reação foi transformada por choque térmico a 42 °C durante 45 segundos para as células competentes de *E. coli* XL1-Blue (Agilent). Os plaqueamentos foram realizados em meio LA com 30 µg/mL de canamicina e 10 µg/mL de tetraciclina, permanecendo a 37 °C durante a noite. Posto isto, repicam-se as colónias selecionadas e preparou-se um pré-inóculo (com os mesmos antibióticos) para isolar plasmídeo com o *kit* da Qiagen. O plasmídeo foi isolado, quantificado e analisado em gel de agarose 1 %. As mutações duplas dirigidas de CbiK^P foram confirmadas por sequenciação.

2.6 - Localização celular da proteína CbiK^P nativa

A proteína CbiK^P contém um sinal peptídico que lhe permite o transporte para o periplasma em *E. coli*, mas ainda não foi avaliado se ocorre o mesmo na proteína nativa, em *Desulfovibrio vulgaris Hildenborough*. Assim sendo, tentou-se elaborar um protocolo de fracionamento que permita analisar os diferentes compartimentos celulares e confirmar a localização da proteína neste microrganismo anaeróbio.

Primeiramente, elaborou-se um *Dot blot* (Capítulo 2.7.7) onde se utilizou uma amostra da CbiK^P selvagem recombinante para testar se o anticorpo primário reconhecia a proteína em questão. Posto isto, preparou-se 1200 ml de meio Wall [65], um meio de lactato/sulfato usualmente empregue no crescimento de *Desulfovibrio vulgaris Hildenborough* para obter uma quantidade suficiente de cultura para realizar o fracionamento dos componentes celulares desta bactéria Gram-negativa.

Tabela 2.11 – Composição do meio Wall [65] utilizado no crescimento de *Desulfovibrio vulgaris Hildenborough*. No final a solução é acertada a pH 7.

Componente	Concentração final
MgCl ₂	8 mM
NH ₄ Cl	20 mM
CaCl	0,6 mM
K ₂ HPO ₄ -NaH ₂ PO ₄	2 mM
FeCl ₂ (125 mM) /EDTA (250 mM)	0,006 mM/0,12 mM
Tris-HCl pH 7	30 mM
Extrato de levedura	1 g/L
Lactato de sódio	60 mM
Sulfato de sódio	30 mM
Solução de elementos vestigiais	MnCl ₂ .4H ₂ O 0,5 g/L + CoCl ₂ .4H ₂ O 0,3 g/L + ZnCl ₂ 0,2 g/L + Na ₂ MoO ₄ .4H ₂ O + H ₃ BO ₃ 0,02 g/L + NiSO ₄ .6H ₂ O 0,1 g/L + CuCl ₂ .2H ₂ O 0,002 g/L + Na ₂ SeO ₃ .5H ₂ O 0,006 g/L + Na ₂ WO ₄ .2H ₂ O 0,008 g/L

O frasco foi desarejado com árgon durante 40 minutos e inoculou-se 5 % do meio com uma cultura do mesmo microrganismo previamente crescida, ficando esta a incubar a 37 °C durante 2 dias, onde se repetiram os últimos dois passos. Ao fim de mais 2 dias, a cultura já apresentava uma elevada densidade e recolheram-se as células durante 12 minutos a 17200 x g no rotor JA-14. O tampão onde se ressuspendem as células após serem recolhidas é o passo determinante no fracionamento dos componentes de *Desulfovibrio*, e assim sendo, seguiram-se 3 protocolos com base em 3 autores distintos. No primeiro protocolo, segundo Western H. [66],

as células foram ressuspensas em tampão Tris-HCl 50 mM com EDTA 50 mM a pH 9 e incubadas durante 15 minutos a 30 °C. O protocolo seguinte (Bell G.) [67] inclui a ressuspensão em tampão Tris-HCl 50 mM com EDTA 1 mM (pH 7,4), sacarose 1 M e 50 µg/mL de lisozima, seguida de uma incubação durante 30 minutos a 30 °C. O terceiro protocolo seguiu o indicado por Teixeira M.[68] e compreende a ressuspensão das células em Tris-HCL 0,1 M com EDTA 0,05 M (pH 7,6), sacarose 0,5 M e 0,2 mg/mL de lisozima, finalizando com uma incubação durante 2 horas a 37 °C. No final centrifugou-se durante 20 minutos a 16831 x g e os sobrenadantes recolhidos correspondem aos diferentes periplasmas, enquanto os *pellets* são ressuspensos em Tris-HCl 50 mM pH 8. De seguida, procedeu-se à lise celular utilizando uma *french press* e a uma nova centrifugação durante 15 minutos a 16831 x g, para descartar as células não partidas, e a uma ultracentrifugação a 228060 x g durante 2 horas para separar as membranas (*pellet*) do citoplasma (sobrenadante).

Realizaram-se 3 *Western Blots* (Capítulo 2.7.7) para os diferentes protocolos, onde foram analisadas as frações anteriormente recolhidas. Assim, cada membrana de nitrocelulose continha a proteína recombinante CbiK^P como controlo positivo e as frações citoplasmáticas, membranares e periplasmática, correspondentes a cada protocolo adotado. Foi ainda realizado um outro *Western Blot* onde se utilizaram as frações do protocolo 3, a CbiK^P recombinante como controlo negativo e o citocromo c3 de *Desulfovibrio vulgaris* Hildenborough como controlo positivo, visto que esta proteína é exclusivamente periplasmática e poderia auxiliar na avaliação da localização da CbiK^P nativa.

2.7 - Técnicas correntes de laboratório

2.7.1 - Protocolo geral de transformação bacteriana por choque térmico

Utilizam-se alíquotas de 100 µL de células bacterianas competentes conservadas a - 80 °C que devem ser descongeladas em gelo. Adiciona-se 10-50 ng de plasmídeo a transformar às células e incubam-se as células com o plasmídeo desejado durante 30 minutos em gelo. As células são submetidas a um choque térmico por incubação a 42 °C, rapidamente seguida de outra em gelo durante 2 minutos. Posteriormente adiciona-se o meio SOC (*Super optimal broth with catabolite repression*) até perfazer 1 mL de volume e coloca-se a agitar durante 1 hora a 37 °C, 180 rpm.

Findo este período, centrifuga-se durante 5 minutos a 7013 x g e ressuspende-se o *pellet* formado em apenas 100 µL do sobrenadante, descartando o excedente do mesmo. No final procede-se ao plaqueamento em placa de Petri com meio LA e o/s antibiótico/s necessário/s e incubada durante a noite a 37 °C.

Composição dos meios usados no protocolo:

SOC: Para 1 mL: 20 µL glucose 1 M + 20 µL 1 MgCl₂ 1 M + 760 µL SOB - pH 7

SOB (*Super optimal broth*): 20 g triptona+ 5 g extrato de levedura+ 0.5 g cloreto de sódio

LA: 15 g bacto agar + 10 g triptona + 10 g cloreto sódio + 5 g extrato de levedura - pH 7

Notas:

- Todos os passos são efetuados em esterilidade numa câmara de fluxo laminar (Bio 48 da Faster) ou à chama, assim como as soluções e meios utilizados são previamente autoclavados durante 20 minutos a 120 °C ou filtrados, no caso dos antibióticos.
- O choque térmico a 42 °C pode ter uma duração de 20 ou 40 segundos, dependendo das células competentes utilizadas.

2.7.2 – Electroforese em gel de poliacrilamida em condições desnaturantes (SDS-PAGE)

Os géis de poliacrilamida utilizados ao longo de todo o trabalho foram montados no sistema de géis Mini-PROTEAN Tetra Cell da Biorad (Figura 2.1).

A composição dos géis é apresentada na tabela 2.12 e a sua montagem inicia-se com a colocação do gel resolvente na parte inferior das placas de vidro, recorrendo-se a persulfato de amónia (PSA) e N,N,N',N'-Tetrametiletenodiamina (Temed) como catalisadores da polimerização da acrilamida



Figura 2.1 - Sistema de géis Mini-PROTEAN Tetra Cell da Biorad utilizado na montagem e corrida de todos os géis de SDS-PAGE utilizados ao longo do trabalho.

Tabela 2.12 - Composição dos géis de SDS-PAGE 12,5% utilizados em várias etapas da caracterização e purificação de proteínas.

Géis Poliacrilamida em condições desnaturantes (SDS-PAGE)	H ₂ O bidestilada (μL)	Tampão Tris-HCl 1.5 M (pH 8.8) + 0.3% (μL)	Tampão Tris-HCl 0.5 M (pH 6.8) + 0.4% SDS (μL)	Acrilamida (μL)	Temed (μL)	PSA 10% (μL)	Volume total (μL)
Gel resolvente (12,5%)	1667	1250	-	2083	10	40	5050
Gel de concentração	1530	-	625	325	10	40	2530

Na parte superior, coloca-se o gel de concentração e utilizam-se os mesmos catalisadores, com a ajuda de um pente formam-se 10 poços e preenche-se o reservatório com tampão de corrida a 1x. Antes de aplicar as amostras no gel, adiciona-se tampão de deposição às mesmas e ferve-se durante 5 minutos, seguindo-se um *spin* de 1 min a 11586 xg numa centrífuga Minispin plus da eppendorf. Utilizaram-se 5 μL do marcador de baixo peso

molecular da Amersham (Anexo 2) e para dar início à corrida, conectou-se o sistema a uma fonte de energia Powerpac 3000 da Biorad, sendo os géis submetidos a uma corrente de 150 V.

Finalizada a corrida, o gel é corado num recipiente com solução de azul de Coomassie a 65 °C durante 15 minutos ou 30 minutos à temperatura ambiente. Por fim, utiliza-se da mesma forma um tampão descorante para revelar a migração das proteínas analisadas.

Composição dos tampões utilizados para SDS-PAGE:

Tampão de corrida: 144 g de Glicina + 30 g de Tris + 10 g SDS + H₂O bidestilada até 2 L (5x concentrado)

Tampão de deposição: 100 mM Tris-HCl pH 6.8 + 4% SDS + 0.2% azul bromofenol + 20 % glicerol + 2% b-MeEtOH (2x concentrado)

Tampão de deposição: 200 mM Tris-HCl pH 6.8 + 8% SDS + 0.4% azul bromofenol + 40 % glicerol + 4% b-MeEtOH (4x concentrado)

Solução corante: 2 g Azul Coomassie R-250 em 833 mL H₂O bidestilada + 833 mL metanol + 333 mL ácido acético glacial (2L) – Filtrar em papel de Whatman antes de utilizar.

Solução descorante: 600 mL metanol + 200 mL ácido acético glacial + H₂O bidestilada até 2 L

2.7.3 - Quantificação de proteína pelo método do ácido bicinonínico (BCA)

Este método utiliza o ácido bicinonínico para a deteção colorimétrica e consequente quantificação de proteína. A redução de Cu²⁺ a Cu⁺ em meio básico permite a deteção seletiva do catião Cu⁺ com o auxílio do reagente BCA pela formação do complexo BCA-Cu⁺-BCA, possuidor de uma cor violeta característica que se deve à estrutura macromolecular da proteína, ao número de ligações peptídicas e especialmente à presença de cisteína, cistina, tirosina e triptofano. O complexo é solúvel em água, apresentando uma elevada absorvância a 562 nm que é linear com o aumento da concentração entre 20 µg/mL e 2000 µg/mL.

O método depende de uma recta de calibração construída com diferentes concentrações de proteína *standard* da Sigma (albumina de soro humano e globulinas gama em 0,9 % de sal e azida de sódio 0,05 %) que se encontra inicialmente a 80 mg/mL e deve ser diluída para 2 mg/mL para facilitar a construção da reta (Tabela 2.13).

Tabela 2.13 - Reta de calibração utilizada na aplicação do método de BCA para quantificação de proteínas.

Concentração de proteína <i>standard</i> inicial (mg/mL)	Concentração de proteína <i>standard</i> final (mg/mL)	Vol final (μL)	Vol inicial proteína (μL)	Vol H ₂ O (μL)
2	0	10	0	100
	0,2		10	90
	0,4		20	80
	0,8		40	60
	1,2		60	40
	1,6		80	20
	2		100	0

Todos os padrões e amostras são preparados num volume final de 100 μL. Colocam-se 25 μL de cada numa placa de 96 poços em duplicado, utilizando-se geralmente algumas diluições das amostras para garantir que estas se encontram na recta de calibração. Posteriormente, adiciona-se o reagente BCA constituído por 50 partes de reagente A para 1 do reagente B, cobrindo a placa com papel de prata para a proteger da luz, e incuba-se a 37 °C durante 30 minutos. O método termina com a leitura da absorvância a 562 nm no leitor de placas e com a elaboração da reta de calibração e da quantidade de proteína em mg/mL.

Composição dos reagentes utilizados no método do BCA:

Reagente A: Carbonato de sódio + bicarbonato de sódio + ácido bicinconínico + tartarato de sódio em 0,1 M de hidróxido de sódio.

Reagente B: Sulfato de cobre a 4 %.

2.7.4 - Quantificação de grupos hémicos pelo método do piridina hemocromo

É possível identificar e quantificar os grupos hémicos presentes em proteínas através de complexos formados pela coordenação de piridina a hemos, os hemocromos. Estes devem ser preparados em meio básico dando-se a desnaturação da proteína que facilita o acesso da piridina ao grupo hémico e possibilite a visualização dos espectros oxidados e reduzidos.

As amostras foram preparadas numa solução com 250 μL de piridina a 40 % e NaOH 200 mM até um volume total de 500 μL preenchidos com diferentes quantidades de proteína, consoante as necessidades do ensaio e adicionando 1 mM de ferricianeto de potássio para auxiliar na obtenção do espectro oxidado. Depois adiciona-se um pouco de ditionito de sódio para garantir condições redutoras e traça-se o espectro. Usou-se como referência o comprimento de onda a 555 nm e subtraiu-se o valor de absorvância do espectro reduzido ao oxidado para obter o redox da amostra. Calculou-se a concentração de hemo com a média de 3 coeficientes de extinção molar (ϵ) distintos (20000, 23000 e 27000 $\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) e no final, a quantidade de hemo por proteína é dada pelo quociente entre a concentração de hemo e concentração de proteína.

2.7.5 – Electroforese em gel de agarose

Os géis foram preparados em tampão TAE com UltraPure agarose da Invitrogen (1% (p/v)), aquecendo a solução para facilitar a homogeneização. Após arrefecimento, adicionou-se o corante SYBR safe (Invitrogen) antes de depositar o gel no suporte e colocar o pente para polimerização, tapando-se o gel com papel de prata para proteger da luz. As amostras são previamente preparadas com tampão de deposição e usou-se como referência o marcador de 1 Kbp da Promega (Anexo 3). Os géis foram corridos a 80 V durante 45 minutos num sistema Mini-Sub Cell GT da Biorad preenchido com tampão TAE, e utilizando uma fonte de alimentação Powerpac 300 da Biorad. Concluída a corrida, o gel é colocado num transiluminador UV Lum e fotografado com uma Electrophoresis Documentation and Analysis System 120 da Kodak.



Figura 2.2 – Sistema de géis Mini-Sub Cell GT da Biorad utilizado na corrida de géis de agarose

Composição do tampão utilizado na electroforese em gel de agarose:

Tampão TAE: p/ 1 L - 242 g Tris + 57,1 mL ácido acético glacial + 100 mL de EDTA 0,5 M a pH 8 + H_2O bidestilada.

2.7.6 - Protocolo de indução de competência pelo método do TB [64]

Preparou-se um pré-inóculo de células de *E. coli*, a partir de um *stock* congelado, em 25 mL de meio LB com o antibiótico devido, que incubou a 37 °C e 150 rpm durante a noite. Posto isto, inoculou-se 25 mL de meio SOB (suplementado com 20 mM de MgCl₂ e antibiótico) com o inóculo preparado no dia anterior (1%). A densidade óptica a 600 nm foi monitorizada durante cerca de 2,5 horas a 37 °C, 150 rpm. Assim que a densidade óptica atingiu o valor de 0,6, o erlenmeyer que contém o meio foi colocado em gelo durante 10 minutos. A cultura foi centrifugada a 2100 x g em JA 25.5 numa centrífuga Avanti J-25I da Beckman durante 10 minutos a 4 °C. O sobrenadante foi removido e ressuspendeu-se o *pellet* em 8 mL de tampão TB gelado, deixando este a incubar 10 minutos em gelo. As células foram novamente centrifugadas e o *pellet* ressuspensão em 2 mL de tampão TB gelado, seguindo-se a adição de 7 % de DMSO (dimetilsulfóxido) e nova incubação em gelo ao longo de 10 minutos. No final o volume foi distribuído por vários eppendorfs previamente arrefecidos com alíquotas de 100 µL e estas foram congeladas em azoto líquido.

Composição das soluções utilizadas no método do TB:

Solução *stock* de magnésio a 2 M: 2 g de MgCl₂ + 2,5 g de MgSO₄ + H₂O bidestilada, filtrou-se a solução (para 10 mL).

Tampão TB: 10 mM Hepes (0,024 g) + 15 mM CaCl₂.2H₂O (0,022g) + 250 mM KCl (0,186 g) em 8 mL de + H₂O bidestilada. Ajustou-se o pH a 6,7 com KOH, adicionou-se 55 mM MnCl₂.4H₂O (0,109 g) e preencheu-se com H₂O bidestilada até aos 10 mL. No final o tampão foi filtrado.

2.7.7 - Western-Blot e Dot Blot

As técnicas de *Western-Blot* e *Dot Blot* são essencialmente utilizadas em bioquímica para detetar proteínas. A segunda é uma simplificação da primeira, uma vez que o *Western Blot* utiliza a electroforese em gel de SDS-PAGE para separar as proteínas consoante o seu peso e o *Dot Blot* apenas as distingue, independentemente do tamanho. São utilizados nas duas técnicas um anticorpo primário específico para a proteína a identificar e um anticorpo secundário que permite um aumento de sinal e facilita a posterior deteção.

No caso do *Western Blot*, preparou-se previamente um gel de SDS-PAGE onde se utiliza, além do marcador de baixo peso molecular da Amersham (Anexo 2), o marcador

Prestained SDS-PAGE broad range da Biorad (Anexo 4). Colocaram-se as amostras em duplicado no gel, para que no final da corrida se pudesse cortar o gel ao meio e corar normalmente com azul de Coomassie, enquanto a outra metade que contém o marcador corado foi transferida para uma membrana de nitrocelulose. Para realizar a transferência cortaram-se 6 papéis de Whatman 3MM e a membrana de nitrocelulose com o tamanho do gel a transferir, equilibrando-se em tampão de transferência para depois colocar no Transblot Semi-dry transfer cell da Biorad. No Semi-dry foram colocadas por esta ordem: 3 papéis de Whatman, membrana, gel a transferir e novamente 3 papéis de Whatman para realizar a transferência durante 1 hora a 15 V, tendo o cuidado de limpar bem o excesso de tampão presente no aparelho. No final da corrida, verificou-se a transferência do gel para a membrana.

No *Dot Blot* foi apenas necessário cortar uma membrana de nitrocelulose e colocar entre 0,5-2 µL de cada amostra a analisar e, a partir daqui, as duas técnicas seguem um procedimento idêntico. As membranas foram então lavadas em tampão TBS e bloqueadas, ficando a agitar, com uma solução 5 % (p/v) de leite magro em pó em TBS durante 1 hora. Esta solução foi então removida e procedeu-se a nova incubação durante 1 hora com a mesma solução mas contendo o anticorpo primário (Anti-rabbit igG purificado por afinidade em 0,02 % de azida de sódio) numa diluição de 1:1000. Terminado este passo, lavou-se a membrana 3 vezes durante 10 minutos com TBS-T e incubou-se com o anticorpo secundário (Anti-rabbit igG - molécula completa produzida em cabra com atividade de fosfatase alcalina) numa diluição de 1:7500 durante 1 hora. Procederam-se a 3 novas lavagens com TBS-T durante 10 minutos e depois a uma passagem rápida por tampão AP. A detecção foi realizada em 10 mL de tampão AP com 10 µL de NBT-BCIP (4-nitrozul de tetrazólio/5-bromo-4-cloro-3-indolil fosfato), cobrindo a membrana para a proteger da luz. Finalmente, observou-se o resultado do ensaio e lavou-se a membrana com água.

Composição dos tampões utilizados no *Dot blot* e *Western Blot*:

Tampão de transferência: 48 mM Tris + 37,7 mM Glicina + 0,05 % (p/v) SDS + 20 % etanol.

Tampão TBS: Tris-HCl 10 mM + 150 mM NaCl a pH 7,5.

Tampão TBS-T: Tris-HCl 20 mM + 500 mM NaCl + 0,05 % (v/v) Tween 20 a pH 7,5.

Tampão AP: Tris-HCl 100 mM + 100 mM NaCl + 5 mM MgCl₂ a pH 9,5.

Capítulo III - Resultados

3.1 - Caracterização bioquímica

A proteína CbiK^P de *Desulfovibrio vulgaris* Hildenborough possui uma estrutura tridimensional tetramérica e é capaz de atuar como cobaltoquelatase e ferroquelatase utilizando sirohidroclorina como substrato em condições anaeróbias. Além disso, contém 2 hemo *b* na sua estrutura, o que a torna única quando comparada com outras enzimas que têm a mesma função. A construção de 7 mutantes dirigidos de CbiK^P teve como objetivo avaliar o papel de resíduos que aparentam ser estruturalmente relevantes na função da proteína através da sua caracterização bioquímica.

Após análise da estrutura cristalográfica da CbiK^P [58], os aminoácidos R54, E76 e H103 foram propostos como relevantes na manutenção da estrutura quaternária da proteína, a H96 foi apontada como a histidina responsável pela ligação ao hemo *b* e os aminoácidos H154, E184 e H216 foram sugeridos como importantes na ligação ao metal a ser inserido por esta quelatase. Todos os aminoácidos referidos foram substituídos por leucinas, e para cada uma das 7 proteínas mutadas, e da proteína selvagem, procedeu-se à sua expressão e purificação (Figuras 3.1 e 3.2), onde se utilizaram as colunas IMAC Sepharose HP e Q-Sepharose HP sequencialmente para obter as proteínas purificadas.

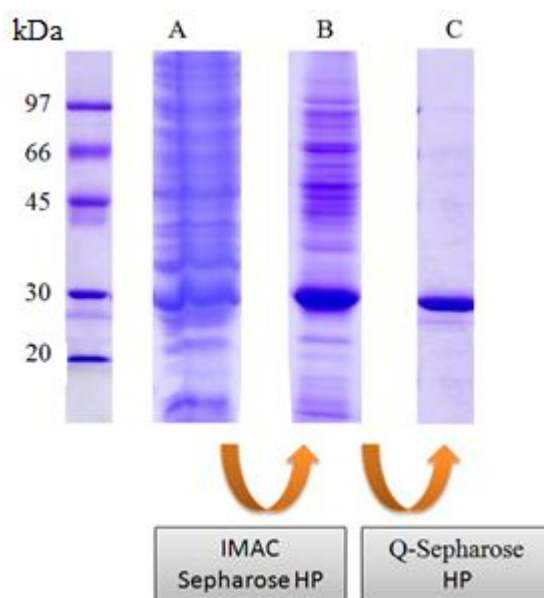


Figura 3.1 – Esquematização do progresso nos passos de purificação adotados, utilizando a CbiK^P selvagem como exemplo, em gel de SDS-PAGE 12,5 %. A) Fração Solúvel, B) fração concentrada após IMAC, C) fração concentrada após Q-Sepharose.

No caso da CbiK^P selvagem e das proteínas mutadas nos aminoácidos H96L, H103L, H154L e H216L, foi necessário utilizar novamente a coluna Q-Sepharose HP para obter as proteínas purificadas.

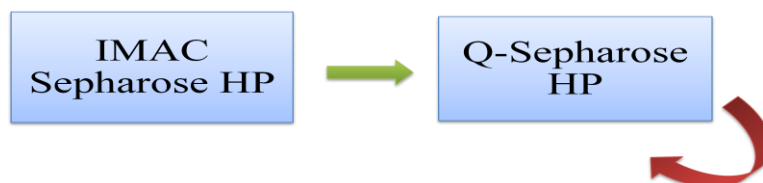


Figura 3.2 – Esquema de purificação utilizado na purificação da proteína CbiK^P selvagem e dos 7 mutantes dirigidos. A seta a vermelho indica a repetição da utilização da coluna Q-Sepharose HP, quando necessário.

As 8 proteínas apresentaram uma massa molecular de 28 kDa após migração em gel de SDS-PAGE, como mostra o exemplo da CbiK^P selvagem na figura 3.3. Os seus espectros de UV-visível mostraram uma banda de Soret a 412 nm e uma banda mais alargada entre 515 e 580 nm (Figura 3.4); após redução, a primeira banda deslocou-se para 425 nm enquanto as bandas alfa e beta típicas de hemo *b* se revelaram a 560 nm e 530 nm. Todas as proteínas apresentaram uma cor rosada devido à presença de hemo *b*, exceto o mutante da histidina 96 (H96L-CbiK^P). Este resultado aponta para que este resíduo seja o responsável pela ligação ao grupo hemo, uma vez que mutado, a proteína recombinante purificada não liga hemo (Figura 3.5).

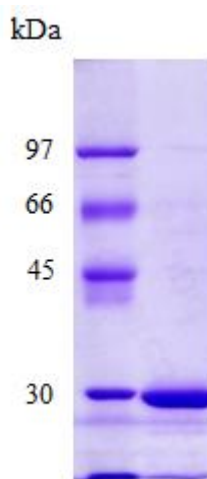


Figura 3.3 - Gel de SDS-PAGE 12,5 % com a CbiK^P selvagem e o marcador de baixo peso molecular da Amersham.

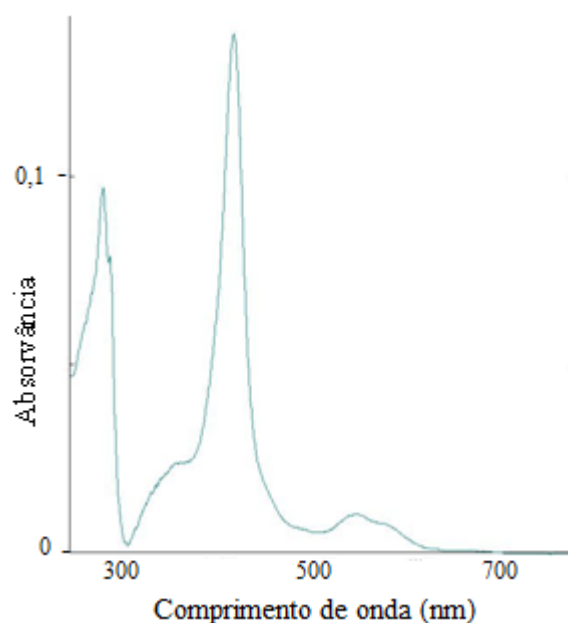


Figura 3.4 - Espectro de UV/visível obtido para a proteína recombinante E76L-CbiK^P na sua forma oxidada.

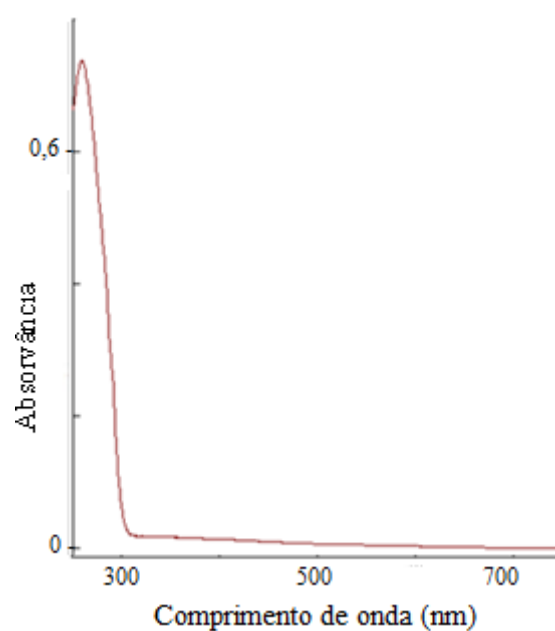


Figura 3.5 - Espectro de UV/visível obtido para a proteína recombinante H96L-CbiK^P na sua forma oxidada, onde se verifica a ausência de hemo *b*.

As 8 proteínas foram quantificadas por BCA, de forma a utilizar a concentração de proteína no cálculo do número de grupos hémicos pelo método do piridina hemocromo e nas atividades de cobaltoquelatase e ferroquelatase. A quantificação de hemo *b* foi analisada tendo como referência o comprimento de onda a 555 nm pelo método do piridina hemocromo, demonstrando a ausência de hemo na proteína H96L-CbiK^P. Pelo contrário, todas as outras proteínas continham 1 hemo *b* por dímero, tal como a proteína selvagem já tinha revelado (tabela 3.1) [61].

Tabela 3.1 - Concentração obtida por BCA das proteínas purificadas, número de hemo *b* por proteína pelo método piridina hemocromo e número de subunidades por proteína.

Proteína	Concentração (mg/mL)	Nº de hemo <i>b</i> por dímero	Número de subunidades
CbiK^P selvagem	1,2	1	4
R54L-CbiK^P	0,5	1	2
E76L-CbiK^P	1	1	2
H96L-CbiK^P	0,4	0	4
H103L-CbiK^P	0,1	1	2
H154L-CbiK^P	0,4	1	4
E184L-CbiK^P	0,9	1	4
H216L-CbiK^P	0,5	1	4

A estrutura quaternária das 8 proteínas recombinantes foi determinada. Para isso utilizou-se a filtração em gel, revelando que as proteínas mutadas nos resíduos propostos como relevantes na manutenção da estrutura da proteína (R54L-CbiK^P, E76L-CbiK^P e H103L-CbiK^P) foram eluídas como dímeros (Tabela 3.1). Nas outras proteínas mutadas nos aminoácidos H96, H154, E184 e H216 e tal como na proteína selvagem, a análise indica que a estrutura tetramérica é mantida.

A atividade de cobaltoquelatase e ferroquelatase foi testada anaerobiamente para a proteína CbiK^P selvagem e para as 7 proteínas mutadas, requerendo a produção de sirohidroclorina, uma vez que este substrato não é comercialmente estável. O substrato foi então preparado a partir de ácido 5-aminolevulínico como descrito no capítulo 2.1, e após incubação de uroporfirinogênio III metiltransferase de *Methanosarcina barkeri* (CobA), porfobilinogênio sintase (HemB), precorrina-2-desidrogenase (SirC) de *Methanothermobacter thermoautotrophics*, porfobilinogênio desaminase (HemC) e uroporfirinogênio III sintase (HemD) de *Bacillus megaterium*, a solução apresentou uma cor roxa que indicava a formação de sirohidroclorina, como confirmado pelo espectro de UV/visível (Figura 3.6).

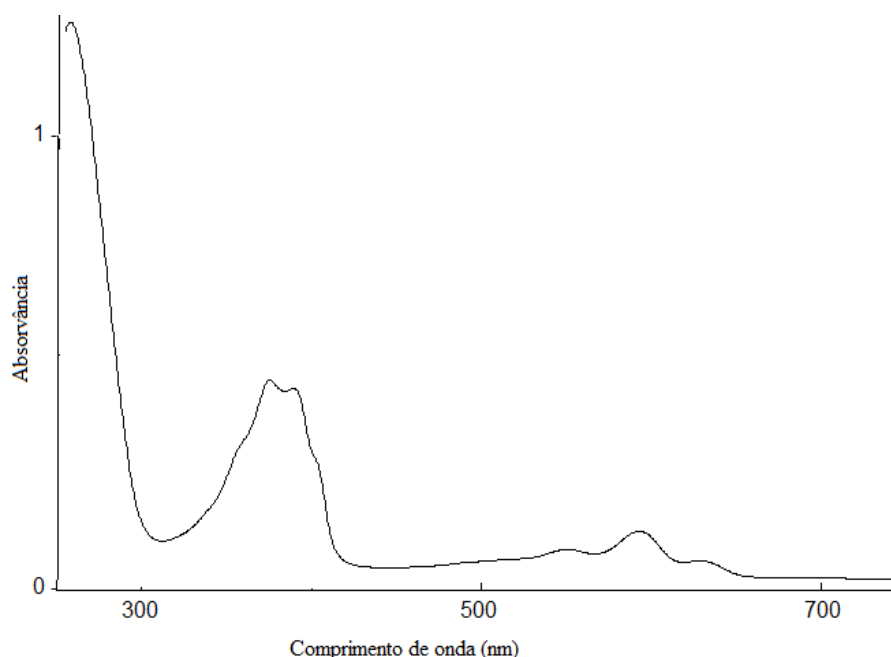


Figura 3.6 - Espectro de UV/visível obtido para a sirohidroclorina produzida anaerobiamente.

Os resultados mostram diferenças assinaláveis nas atividades obtidas (Tabela 3.2), onde se constata que a atividade com cobalto é superior à atividade com ferro independentemente do aminoácido mutado, assim como na proteína selvagem. As proteínas mutadas R54L-CbiK^P e E76L-CbiK^P revelaram valores de atividade próximos da proteína selvagem, enquanto H96L-CbiK^P e H103L-CbiK^P apresentaram maior atividade com os dois metais. Para proteínas mutadas nos aminoácidos propostos como responsáveis pela ligação ao metal registaram-se algumas diferenças, como é o caso da proteína E184L-CbiK^P com cobalto. Esta proteína mutada não sofreu uma diminuição da atividade (como seria esperado) revelando até, uma atividade superior à da proteína selvagem. As proteínas H154L-CbiK^P e H216L-CbiK^P demonstram muito menor atividade com os dois metais, mostrando que as mutações nestes aminoácidos implicam uma perda da atividade de cobaltoquelatase e ferroquelatase por parte da proteína.

Tabela 3.2 – Atividades específicas de cobaltoquelatase e ferroquelatase de CbiK^P e dos 7 mutantes dirigidos.

Proteína	Atividade (nmol.min ⁻¹ .mg ⁻¹)	
	Cobaltoquelatase	Ferroquelatase
CbiK^P selvagem	35 ± 1	10 ± 4
R54L-CbiK^P	49 ± 21	3 ± 1
E76L-CbiK^P	27 ± 9	2 ± 0,1
H96L-CbiK^P	108 ± 21	11 ± 2
H103L-CbiK^P	97 ± 20	12 ± 3
H154L-CbiK^P	3 ± 1	2 ± 1
E184L-CbiK^P	97 ± 6	0,3 ± 0,1
H216L-CbiK^P	5 ± 0,1	0,3 ± 0,2

3.2 - Complementação da estirpe $\Delta cysG$ de *E. coli* pelos mutantes dirigidos de CbiK^P

A complementação da estirpe de *E. coli* 302 Δ a mutada na *cysG* foi utilizada para avaliar a capacidade dos mutantes dirigidos de CbiK^P restabelecerem o fenótipo desta estirpe deficiente na atividade de sirohidroclorina ferroquelatase, para assim se avaliar a capacidade das proteínas mutadas atuarem na biossíntese de sirohemo *in vivo*.

Foi previamente demonstrado para a CbiK de *Salmonella typhimurium* [53], as CbiX de *Methanosarcina barkeri* e *Methanobacter thermoautotrophicum* [59] e pelas próprias CbiK de *Desulfovibrio vulgaris* Hildenborough [61], que estas proteínas têm a capacidade de complementar *in vivo* a estirpe $\Delta cysG$ de *E. coli*. Uma vez que a biossíntese de sirohemo em *E. coli* é realizada no citoplasma e de forma a avaliar a capacidade dos mutantes dirigidos de CbiK^P atuarem como sirohidroclorina ferroquelatase *in vivo*, os genes respectivos foram amplificados de forma a que a proteína gerada não contenha o sinal peptídico e assim evitar que a proteína seja transportada para o periplasma. A amplificação do DNA dos 7 genes mutados foi efetuada com a enzima Vent DNA polimerase, seguindo-se a digestão com Nde I e Hind III e a clonagem em pETac (Figuras 3.7, 3.8 e 3.9, ver capítulo 2.4). Estes foram transformados para a

estirpe de *E. coli* 302Δa com o plasmídeo pCIQ-*sirCcobA* (contém os genes *sirC* e *cobA* necessários à produção de sirohidroclorina). A estirpe de *E. coli* 302Δa pCIQ-*sirCcobA* não é capaz de produzir sirohemo e como consequência incapaz de assimilar sulfuretos, requerendo cisteína para crescer em meio mínimo M9. Na presença da CbiK^P, que atua *in vivo* como sirohidroclorina ferroquelatase, esta estirpe torna-se capaz de crescer em meio mínimo M9 na ausência de cisteína.

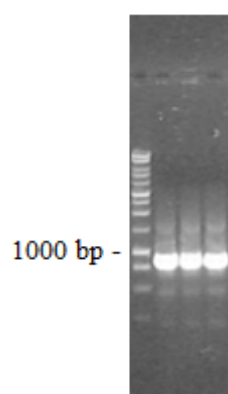


Figura 3.7 – DNA de 3 genes mutados de CbiK^P após amplificação com Vent DNA polimerase em gel de agarose 1% e marcador 1Kbp da Promega.

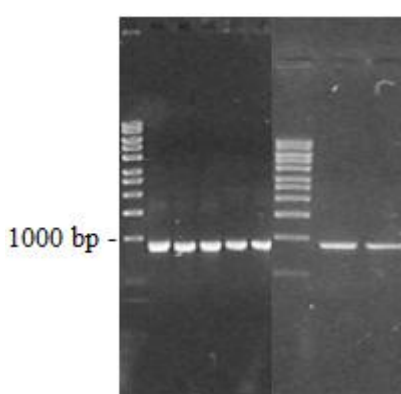


Figura 3.8 – Mutantes dirigidos de CbiK^P digeridos com Nde I/Hind III em gel de agarose 1% com marcador 1 Kbp da Promega.

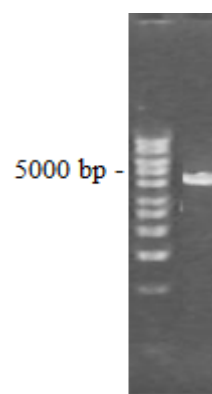


Figura 3.9 - pETac isolado em gel de agarose 1% com marcador 1 Kbp da Promega.

Realizou-se um controlo negativo que valida os dados obtidos, uma vez que na ausência de uma enzima que atue como sirohidroclorina ferroquelatase, apenas se observa complementação na presença de cisteína. Os meios mínimos que continham cisteína servem como controlo positivo aos ensaios efetuados. Os resultados obtidos são idênticos para todos os mutantes dirigidos de CbiK^P na presença ou ausência de cisteína, evidenciando que a complementação *in vivo* da estirpe de *E. coli* 302Δa mutada na *cysG* é sempre conseguida.

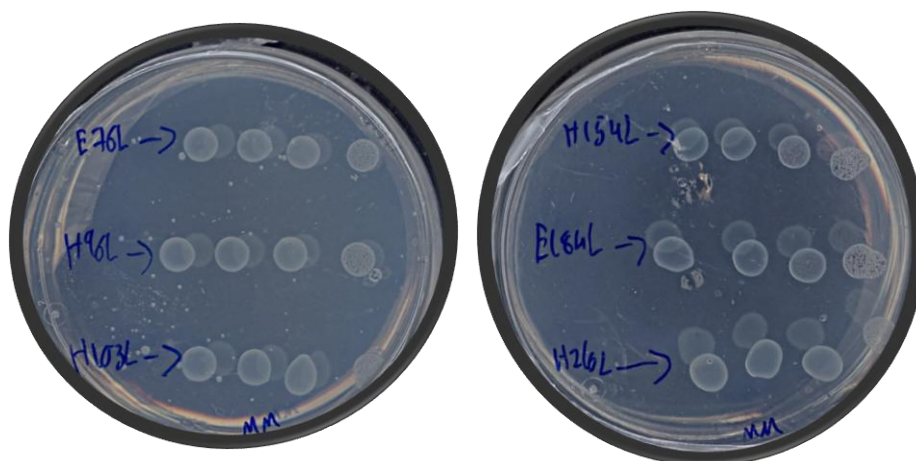


Figura 3.10 - Complementação de *E. coli* 302Δa-pCIQ-*sirCcobA* pelos mutantes dirigidos de CbiK^P em placa de meio mínimo M9 sem cisteína.

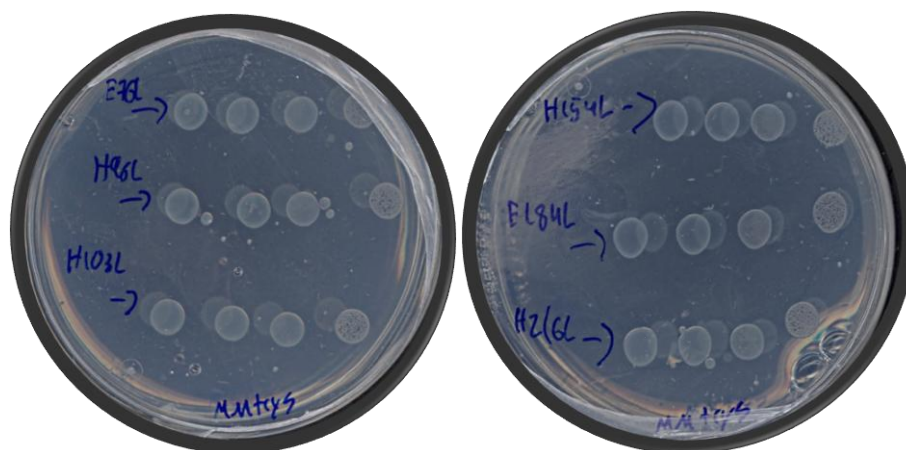


Figura 3.11 - Complementação de *E. coli* 302Δa-pCIQ-*sirCcobA* pelos mutantes dirigidos de CbiK^P em placa de meio mínimo M9 com cisteína.

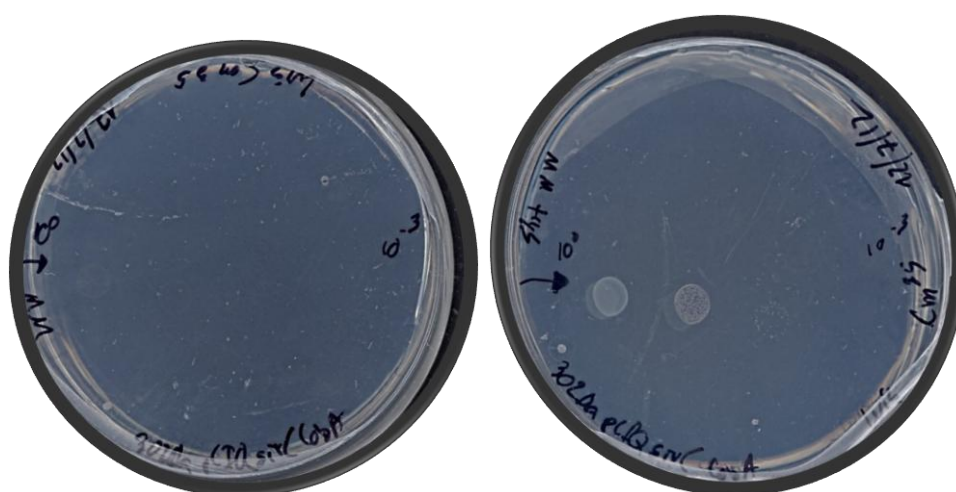


Figura 3.12 - Controlo negativo efetuado para o ensaio com *E. coli* 302Δa-pCIQ-*sirCcobA* em meio mínimo M9 na ausência (esquerda) e presença de (direita) cisteína.

3.3 – Localização celular da proteína CbiK^P nativa

Um outro objetivo do trabalho foi determinar a localização da proteína CbiK nativa de *Desulfovibrio vulgaris* Hildenborough, uma vez que só se tem conhecimento de esta ser periplasmática quando é produzida heterologicamente em *E. coli*. Deste modo, realizou-se um *Dot Blot* onde se colocaram 1 e 2 μL da proteína recombinante e procedeu-se ao ensaio com o anticorpo primário da CbiK^P (Anti-rabbit igG), obtendo-se um sinal de cor roxa dado pelo anticorpo secundário (Anti-rabbit igG) que indica a localização da proteína CbiK^P por uma reação de fosfatase alcalina (Capítulo 2.7.7).



Figura 3.13 - Membrana de nitrocelulose após *Dot Blot* onde é visível o reconhecimento da proteína CbiK^P pelo seu anticorpo primário. Os números 1 e 2 indicam os µL utilizados da proteína recombinante no ensaio.

A bactéria Gram-negativa *Desulfovibrio vulgaris* Hildenborough foi crescida anaerobiamente em meio *Wall* a 37 °C e realizaram-se 3 protocolos distintos para obtenção das frações celulares (Capítulo 2.6). Efetuaram-se 3 *Western Blots* onde se pretendeu avaliar a eficiência do fracionamento e a consequente localização da proteína estudada, analisando as diferentes frações celulares. Nos dois primeiros protocolos descritos no capítulo 2.6, os ensaios realizados indicam a presença de CbiK^P (28 kDa) apenas nas frações citoplasmáticas, enquanto o protocolo 3 aponta para a presença, sobretudo, na fração periplasmática e em menor quantidade na fração citoplasmática (Figura 3.14).

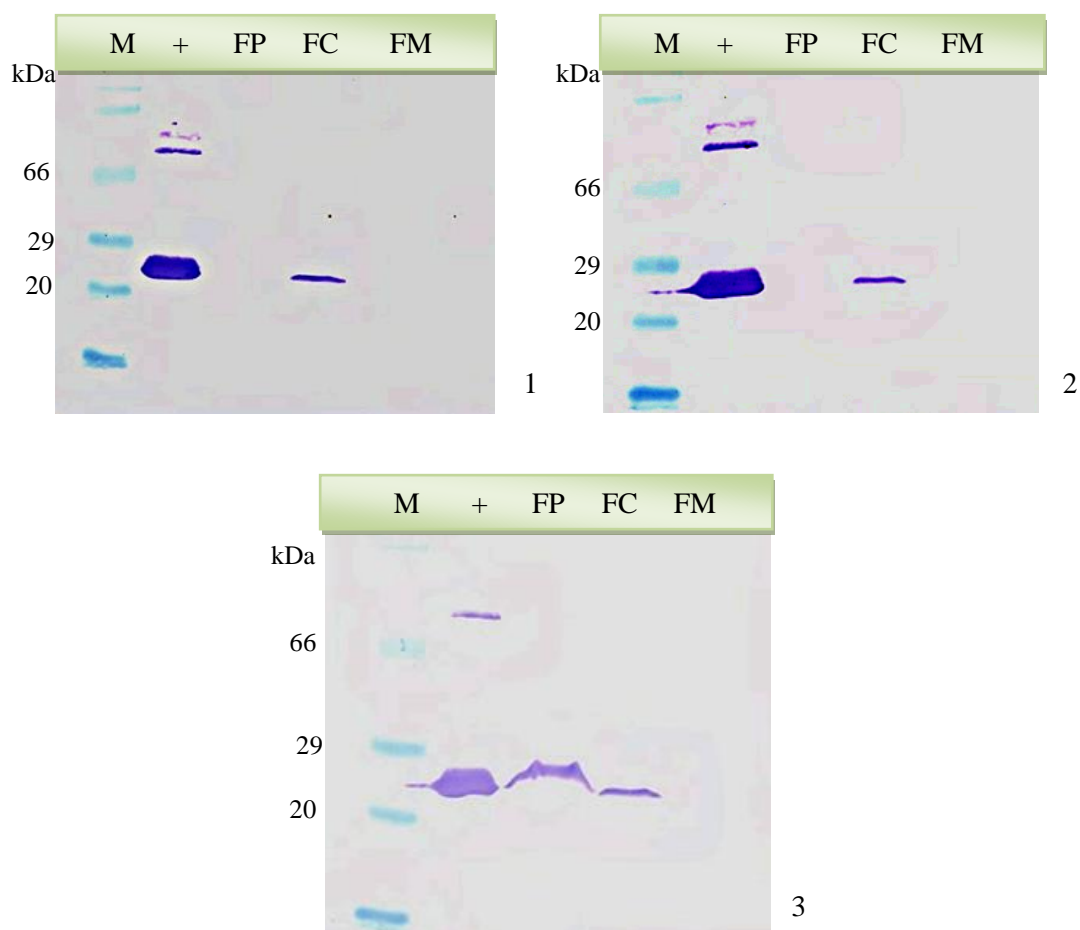


Figura 3.14 – Membranas de nitrocelulose para os 3 protocolos utilizados no fracionamento celular de *Desulfovibrio vulgaris* Hildenborough. M) Marcador *Prestained SDS-PAGE broad range*; +) Controlo positivo do ensaio, a proteína CbiK^P recombinante; FP) Fração periplasmática; FC) Fração citoplasmática e FM) Fração membranas. Os números junto à membrana indicam o protocolo utilizado.

De forma a certificar a eficiência do fracionamento, realizou-se um *Western Blot* onde se utilizaram as frações celulares de *Desulfovibrio vulgaris* Hildenborough obtidas no protocolo 3 e o citocromo c3 e o seu anticorpo específico para confirmar se o periplasma teria sido bem extraído, uma vez que esta proteína é exclusivamente periplasmática. Apesar de neste ensaio não ter sido possível observar o controlo positivo efetuado com o citocromo c3, o anticorpo primário deste reconheceu a presença da proteína nas frações periplasmática, citoplasmáticas e membranares, gerando algumas interrogações relativamente à eficiência do fracionamento celular.

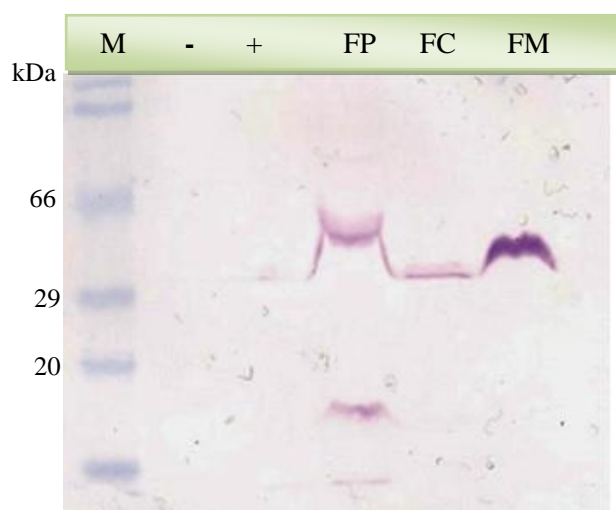


Figura 3.15 - Membrana de nitrocelulose usada no *Western Blot* realizado com citocromo c3 de *Desulfovibrio vulgaris* Hildenborough e o seu anticorpo específico. M) Marcador *Prestained SDS-PAGE broad range*; +) Controlo positivo do ensaio, o citocromo c3 -) Controlo negativo, a CbiK^P recombinante; FP) Fração periplasmática do protocolo 3; FC) Fração citoplasmática do protocolo 3 e FM) Fração membranares do protocolo 3.

Capítulo IV - Discussão de resultados

A bactéria Gram-negativa *Desulfovibrio vulgaris* Hildenborough possui duas quelatases no seu genoma, uma citoplasmática (CbiK^C) e outra periplasmática (CbiK^P). Neste trabalho pretendeu-se estudar a influência de diferentes resíduos de aminoácidos da proteína CbiK^P que foram propostos como relevantes na manutenção da sua estrutura quaternária, na ligação ao hemo *b* e no seu centro ativo. Após construção de 7 proteínas recombinantes com mutações simples nesses aminoácidos (R54, E76, H96, H103, H154, E184 e H216), procedeu-se à expressão e purificação destas e da proteína selvagem, de forma a realizar a sua caracterização bioquímica. Esta foi efetuada por avaliação do estado oligomérico, quantificação do número de grupos hémicos e teste das atividades como cobaltoquelases e ferroquelatase. Testou-se ainda a complementação da estirpe de *E. coli* mutada na *cysG* por parte dos 7 mutantes dirigidos de CbiK^P e a elaboração de um protocolo que permitisse determinar a localização celular da proteína CbiK^P nativa.

4.1 - Caracterização bioquímica

A quantificação de grupos hémicos da proteína selvagem e das 7 proteínas mutadas revelou a presença de 2 hemos *b* por tetrâmero de proteína pelo método do piridina hemocromo, sabendo que cada hemo se encontra entre cada dímero de proteína, como a estrutura cristalográfica da proteína já tinha revelado [58]. As proteínas mutadas nos aminoácidos propostos como influentes na manutenção da estrutura quaternária da proteína (R54L, E76L e H103L) e na ligação aos metais inseridos em tetrapirroles (H154L, E184L e H216L) revelaram um número de hemos idêntico à CbiK^P selvagem. Assim, é possível compreender que estes aminoácidos conservam os grupos prostéticos na estrutura da proteína estudada. No caso da proteína recombinante H96L, a ausência de qualquer grupo hémico, revelada no método utilizado, demonstra que este aminoácido é preponderante na ligação aos hemos *b* e que é o responsável pela presença deste cofator na proteína.

A análise ao estado oligomérico da proteína CbiK^P aponta para que as proteínas mutadas nos aminoácidos sugeridos como importantes na ligação ao metal (H154L, E184L e H216L) e a proteína H96L-CbiK^P mantenham a estrutura tetramérica da proteína. Assim se observa que a presença de hemo *b* na proteína é independente da sua estrutura, o que exclui o pressuposto que este cofator único em cobaltoquelatases tenha influência na estrutura tetramérica da proteína. Os aminoácidos R54, E76 e H103 foram previamente apontadas como relevantes na estrutura quaternária da proteína CbiK^P e, após mutação simples dos mesmos resíduos e avaliação da sua influência na estrutura quaternária da proteína, constatou-se que em

cada proteína recombinante mutada a proteína perde a sua estrutura tetramérica e adquire a forma de dímero. Deste modo é possível corroborar a influência destes 3 aminoácidos na manutenção da estrutura tridimensional da proteína estudada.

Foram testadas em meio anaeróbio, as atividades de cobaltoquelatase e ferroquelatase da CbiK^P selvagem e das 7 proteínas recombinantes mutadas. A proteína selvagem e as proteínas mutadas nos aminoácidos R54 e E76 revelaram valores de atividade (ver tabela 3.2) idênticos às já previamente obtidas para os dois metais [61], verificando-se uma estabilidade na atividade da proteína. Já a proteína recombinante H103L-CbiK^P apresenta uma atividade superior como cobaltoquelatase (97 nmol.min⁻¹.mg⁻¹) e similar às anteriores como ferroquelatase. Tendo conhecimento que este aminoácido foi proposto como importante na manutenção da estrutura oligomérica da proteína e que os outros dois aminoácidos (R54 e E76), à partida com a mesma relevância, não alteraram a atividade de cobaltoquelatase, não seria expectável este aumento. No entanto, a proteína sem hemo (H96L-CbiK^P) também apresenta um comportamento semelhante à proteína anteriormente referida. Conhecendo a estrutura tridimensional da proteína e sabendo que o hemo *b* se encontra afastado da cavidade indicada como o local de ligação ao metal [58], não seria de prever uma variação na atividade da proteína. Ainda assim, pode-se conjecturar que a ausência de hemo facilite a entrada do metal no local indicado, e que o hemo deverá ter outra função nesta proteína, como por exemplo, o de transporte de ferro. Analisando os valores de atividade obtidos para as CbiK de *Desulfovibrio vulgaris* Hildenborough nesta dissertação e noutro estudo [61], verifica-se que estas são, em geral, inferiores às de enzimas de outros microrganismos (Tabela 4.1), reforçando a ideia da CbiK^P ter outra função, tal como a CbiK^C, cujo estudo aponta para que esteja envolvida na biossíntese de vitamina B₁₂.

Tabela 4.1 – Tabela comparativa das atividades de cobaltoquelatase e ferroquelatase por parte de vários microrganismos em outras análises. a) Dados obtidos neste estudo.

Quelatase	Microrganismo	Atividade (nmol.min ⁻¹ .mg ⁻¹)	
		Cobaltoquelatase	Ferroquelatase
CbiX	<i>Methanosarcina barkeri</i>	122 [59]	-
CbiX	<i>Methanobacter thermoautotrophicum</i>	18 [59]	-
CbiX	<i>Bacillus megaterium</i>	318 [35]	-
SirB	<i>Bacillus megaterium</i>	337 [35]	-
SirB	<i>Arabidopsis thaliana</i>	48,5 [69]	5,4 [69]
CbiK^P	<i>Desulfovibrio vulgaris</i> Hildenborough	22 [61]	13 [61]
CbiK^C	<i>Desulfovibrio vulgaris</i> Hildenborough	4 [61]	1,5 [61]
CbiK^P	<i>Desulfovibrio vulgaris</i> Hildenborough	35 a)	10 a)

Os aminoácidos H154, E184 e H216 foram propostos como responsáveis pela ligação aos metais e após testadas as atividades das proteínas recombinantes mutadas, compreendeu-se

que as proteínas mutadas nas histidinas perderam as atividades de cobaltoquelatases e ferroquelatases, exibindo valores residuais. No caso de E184L-CbiK^P, a atividade como cobaltoquelatase é mantida, quando como ferroquelatase é praticamente inexistente. Este é o único caso onde as atividades com os dois metais não têm o mesmo comportamento, visto que a atividade com cobalto é sempre superior à com ferro, e este aminoácido poderá ser específico para o cobalto, explicando a ausência de atividade como ferroquelatase. Conforme indicado, os aminoácidos H154 e H216 são nitidamente responsáveis pela ligação aos metais, influenciando a atividade da proteína, enquanto o E184 só influencia negativamente a atividade de ferroquelatase. Contudo, e apesar de algumas atividades terem já sido testadas com diferentes *pools* da mesma proteína (como foi o caso da proteína recombinante H103L-CbiK^P), será necessário confirmar alguns valores de atividade para que se compreenda exatamente a influência destes 7 aminoácidos no comportamento da proteína CbiK^P.

4.2 - Complementação da estirpe $\Delta cysG$ de *E. coli* pelos mutantes dirigidos de CbiK^P

A complementação da estirpe $\Delta cysG$ de *E. coli* já tinha sido verificado pela proteína selvagem, atuando como sirohidroclorina ferroquelatase, tal como a CbiK de *Salmonella typhimurium* [53], as CbiX de *Methanosarcina barkeri* e *Methanobacter thermoautotrophicum* [59] e a SirB de *Bacillus megaterium* [35]. No entanto, os mutantes dirigidos de CbiK^P não revelaram diferenças assinaláveis. Ao contrário do que sucedera *in vitro*, os mutantes dirigidos não afetaram a complementação *in vivo* da estirpe capaz de produzir sirohidroclorina mas incapaz de produzir sirohemo. O mais curioso é que quando se estuda esta complementação é a atividade de ferroquelatase que é testada, e essa demonstrou ser muito reduzida nos ensaios *in vitro*. Seria de esperar que, pelo menos a proteína mutada nos aminoácidos propostos como responsáveis pela ligação aos metais (H154L, E184L e H216L) evidenciassem uma menor complementação. Todavia, estes resultados apontam para que as proteínas mutadas nestes aminoácidos sejam capazes de complementar a estirpe $\Delta cysG$ de *E. coli* ou circundar as deficiências eventualmente originadas por estes, mesmo que exibam uma atividade residual *in vitro*, e de atuar como sirohidroclorina ferroquelatases no fenótipo deficiente nesse passo enzimático. Porém, as mutações duplas H154L/E184L-CbiK^P, H154L/H216L-CbiK^P e E184L/H216L-CbiK^P e a mutação tripla H154L/E184L/H216L-CbiK^P podem ser uma alternativa para testar a complementação e avaliar se ocorrem diferentes comportamentos da proteína consoante o par ou o trio de aminoácidos mutados.

4.3 - Localização celular da proteína CbiK^P nativa

As técnicas de *Dot Blot* e *Western Blot* foram utilizadas na localização da proteína CbiK^P nativa, permitindo a identificação desta a partir de extratos celulares de *Desulfovibrio vulgaris* Hildenborough. Primeiramente, confirmou-se a possibilidade de detetar o sinal com um *Dot Blot* e realizaram-se 3 protocolos diferentes no que diz respeito ao fracionamento dos componentes celulares em *Desulfovibrio*. Os protocolos variam essencialmente na concentração de Tris-HCl, EDTA, lisozima, pH e tempo de incubação. Nos dois primeiros protocolos [66, 67] só foi possível identificar a proteína CbiK^P na fração citoplasmática, enquanto no terceiro esta foi também localizada na fração periplasmática. Tal deverá ter ocorrido no protocolo 3[68] devido ao aumento da concentração de lisozima e do tempo de incubação, permitindo uma rotura da cadeia de peptidoglicano e um isolamento mais eficaz da fração periplasmática.

A realização de um ensaio de *Western Blot* utilizando uma proteína exclusivamente periplasmática, o citocromo c3 de *Desulfovibrio vulgaris* Hildenborough, tinha como objetivo confirmar se o periplasma tinha sido corretamente extraído no terceiro protocolo. Neste ensaio não foi possível obter um controlo positivo, no entanto, o anticorpo do citocromo c3 não reconheceu a proteína CbiK^P (controlo negativo), como seria de esperar, mas identificou o citocromo c3 nas frações periplasmática, citoplasmática e membranas. Tendo em conta a conhecida localização do citocromo c3 e apesar da ausência de controlo positivo, compreende-se que o fracionamento não foi totalmente eficaz e que deverá ter ocorrido uma mistura de frações celulares. Deste modo, é ainda necessário aperfeiçoar o terceiro protocolo de fracionamento, aumentando (p.e.) o tempo de incubação.

Capítulo V - Conclusão

Ao longo deste trabalho experimental foram avaliadas várias propriedades da proteína CbiK^P de *Desulfovibrio vulgaris* Hildenborough. Assim, utilizou-se a CbiK^P selvagem e 7 proteínas com mutações simples nos aminoácidos R54, E76, H96, H103, H154, E184 e H216, em ensaios para realizar a sua caracterização bioquímica e avaliar se seriam capazes de restabelecer o fenótipo de uma estirpe de *E. coli* capaz de produzir sirohidroclorina mas incapaz de produzir sirohem. Construíram-se duas mutações duplas dirigidas nos aminoácidos propostos como relevantes na ligação ao cobalto e ao ferro, tentando-se ainda elaborar um protocolo eficiente de fracionamento celular da bactéria *Desulfovibrio vulgaris* Hildenborough, para confirmar a localização da proteína CbiK^P nativa.

A quantificação de grupos hémicos confirmou que a H96 é responsável pela ligação ao hemo *b*, uma vez que a proteína recombinante mutada nesse aminoácido não continha hemo, enquanto todas as outras mantiveram o hemo *b*. Os aminoácidos R54, E76 e H103 mostraram a sua influência na manutenção da estrutura quaternária da proteína, uma vez que as proteínas com mutações simples nesses aminoácidos assumiram uma estrutura dimérica, ao contrário da proteína selvagem e das outras proteínas mutadas que apresentaram a forma de tetrâmero. Os aminoácidos H96, H154, E184 e H216 indicaram variações nas atividades de cobaltoquelase e ferroquelatase em meio anaeróbio demonstrando, particularmente, a clara influência das duas últimas histidinas propostas inicialmente como essenciais na ligação ao metal a ser quelatado. Por outro lado, o aminoácido E184 também tinha sido apontado como tendo a mesma função, mas nos ensaios efetuados a proteína mutada exibiu atividade de cobaltoquelatase e ausência de atividade de ferroquelatase, podendo este aminoácido ser específico para a atividade com este metal.

A complementação *in vivo* da estirpe de *E. coli* Δ cysG foi efetuada por todos os 7 mutantes dirigidos de CbiK^P, apesar das mutações dirigidas em aminoácidos propostos como importantes na atividade de sirohidroclorina ferroquelatase (H154, E184 e H216). Decidiram-se então, realizar mutações em dois ou três destes aminoácidos na mesma proteína para avaliar se desse modo se conseguiriam observar diferenças assinaláveis ao nível da complementação.

Por último, o protocolo utilizado para fracionar os componentes celulares de *Desulfovibrio vulgaris* Hildenborough (adaptado de Teixeira M.[68]) e localizar a proteína CbiK^P nativa não se revelou totalmente eficaz nos ensaios realizados, uma vez que a proteína foi identificada nas frações periplasmática e citoplasmática, apontando para um fracionamento incompleto ou imperfeito.

Esta dissertação teve o intuito de auxiliar no estudo da proteína CbiK^P e no modo como se comporta *in vivo* e *in vitro*, além da sua localização na bactéria Gram-negativa redutora de sulfato.

Bibliografia

1. Shen, Y. and R. Buick, *The antiquity of microbial sulfate reduction*. Earth-Science Reviews, 2004. **64**(3–4): p. 243-272.
2. Referenciado em [10]
3. R. Rabus, T.A.H., F. Widdel, M. Dworkin, S. Falkow, E. Rosenberg, K.-H. Schleifer, E. Stackebrandt, Eds., *The Prokaryotes 2*, 659-768 (2006).
4. Finlay, B.J., A. S. W. Span, and J. M. P. Harman. , *Nitrate respiration in primitive eukaryotes*. *Nature* 303:333–336, 1983
5. Payne, W.J., *Anaerobic Respiration*, in eLS. 2001, John Wiley & Sons, Ltd.
6. Muyzer, G. and A.J. Stams, *The ecology and biotechnology of sulphate-reducing bacteria*. *Nat Rev Microbiol*, 2008. **6**(6): p. 441-54.
7. Peck, H.D., Jr., *Enzymatic basis for assimilatory and dissimilatory sulfate reduction*. *J Bacteriol*, 1961. **82**: p. 933-9.
8. Lobo, S.A., et al., *The anaerobe Desulfovibrio desulfuricans ATCC 27774 grows at nearly atmospheric oxygen levels*. *FEBS Lett*, 2007. **581**(3): p. 433-6.
9. Cypionka, H., *Oxygen respiration by desulfovibrio species*. *Annu Rev Microbiol*, 2000. **54**: p. 827-48.
10. R. Rabus, T.A.H., F. Widdel, M. Dworkin, S. Falkow, E. Rosenberg, K.-H. Schleifer, E. Stackebrandt, Eds., *The Prokaryotes 2*, 659-768 (2006).
11. Minz, D., et al., *Diversity of sulfate-reducing bacteria in oxic and anoxic regions of a microbial mat characterized by comparative analysis of dissimilatory sulfite reductase genes*. *Appl Environ Microbiol*, 1999. **65**(10): p. 4666-71.
12. Sen, A.M., *Acidophilic Sulphate Reducing Bacteria: Candidates for Bioremediation of Acid Mine Drainage Pollution*. Thesis, Univ. Wales (2001)
13. Dar, S.A., J.G. Kuenen, and G. Muyzer, *Nested PCR-denaturing gradient gel electrophoresis approach to determine the diversity of sulfate-reducing bacteria in complex microbial communities*. *Appl Environ Microbiol*, 2005. **71**(5): p. 2325-30.
14. Devereux, R., et al., *Diversity and origin of Desulfovibrio species: phylogenetic definition of a family*. *J Bacteriol*, 1990. **172**(7): p. 3609-19.
15. Castro, H.F., N.H. Williams, and A. Ogram, *Phylogeny of sulfate-reducing bacteria*. *FEMS Microbiol Ecol*, 2000. **31**(1): p. 1-9.
16. Stackebrandt, E., Stahl, D.A. and Devereux, R. , *Taxonomic relationships*. In: *Sulfate-Reducing Bacteria* (Barton, L.L., Ed.), pp.49^87. Plenum Press, New York
17. Voordouw, G., *The genus desulfovibrio: the centennial*. *Appl Environ Microbiol*, 1995. **61**(8): p. 2813-9.
18. Postgate, J.R. and L.L. Campbell, *Classification of Desulfovibrio species, the nonsporulating sulfate-reducing bacteria*. *Bacteriol Rev*, 1966. **30**(4): p. 732-8.
19. Der Vartanian, D.V. and J. LeGall, *A monomolecular electron transfer chain: structure and function of cytochrome C3*. *Biochim Biophys Acta*, 1974. **346**(1): p. 79-99.
20. Volbeda, A., et al., *Crystal structure of the nickel-iron hydrogenase from Desulfovibrio gigas*. *Nature*, 1995. **373**(6515): p. 580-7.
21. Postgate, J.R., *The sulphate-reducing bacteria*. 2nd ed. 1984, Cambridge Cambridgeshire ; New York: Cambridge University Press. x, 208 p.
22. Devereux, R., et al., *Natural relationships among sulfate-reducing eubacteria*. *J Bacteriol*, 1989. **171**(12): p. 6689-95.
23. Heidelberg, J.F., et al., *The genome sequence of the anaerobic, sulfate-reducing bacterium Desulfovibrio vulgaris Hildenborough*. *Nat Biotechnol*, 2004. **22**(5): p. 554-9.

24. Goldstein, E.J., et al., *Desulfovibrio desulfuricans bacteremia and review of human Desulfovibrio infections*. J Clin Microbiol, 2003. **41**(6): p. 2752-4.
25. Jia, W., et al., *Diversity and distribution of sulphate-reducing bacteria in human faeces from healthy subjects and patients with inflammatory bowel disease*. FEMS Immunol Med Microbiol, 2012.
26. Finegold, S.M., *Desulfovibrio species are potentially important in regressive autism*. Med Hypotheses, 2011. **77**(2): p. 270-4.
27. Ben Ali Gam, Z., et al., *Desulfovibrio tunisiensis sp. nov., a novel weakly halotolerant, sulfate-reducing bacterium isolated from exhaust water of a Tunisian oil refinery*. Int J Syst Evol Microbiol, 2009. **59**(Pt 5): p. 1059-63.
28. Blumenberg, M., et al., *Hopanoid production by Desulfovibrio bastinii isolated from oilfield formation water*. FEMS Microbiol Lett, 2009. **293**(1): p. 73-8.
29. Croese, E., et al., *Analysis of the microbial community of the biocathode of a hydrogen-producing microbial electrolysis cell*. Appl Microbiol Biotechnol, 2011. **92**(5): p. 1083-93.
30. Hulshoff Pol, L.W., et al., *Anaerobic treatment of sulphate-rich wastewaters*. Biodegradation, 1998. **9**(3-4): p. 213-24.
31. Cappitelli, F., et al., *Improved methodology for bioremoval of black crusts on historical stone artworks by use of sulfate-reducing bacteria*. Appl Environ Microbiol, 2006. **72**(5): p. 3733-7.
32. Zhang, Y., et al., *A marine sulfate-reducing bacterium producing multiple antibiotics: biological and chemical investigation*. Mar Drugs, 2009. **7**(3): p. 341-54.
33. Beale, S.I., *Enzymes of chlorophyll biosynthesis*. Photosynthesis Research, 1999. **60**(1): p. 43-73.
34. Thauer, R.K. and L.G. Bonacker, *Biosynthesis of coenzyme F430, a nickel porphinoid involved in methanogenesis*. Ciba Found Symp, 1994. **180**: p. 210-22; discussion 222-7.
35. Raux, E., et al., *Identification and functional analysis of enzymes required for precorrin-2 dehydrogenation and metal ion insertion in the biosynthesis of sirohaem and cobalamin in Bacillus megaterium*. Biochem J, 2003. **370**(Pt 2): p. 505-16.
36. Bali, S., et al., *Molecular hijacking of siroheme for the synthesis of heme and d1 heme*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2011. **108**(45): p. 18260-5.
37. Raux, E., H.L. Schubert, and M.J. Warren, *Biosynthesis of cobalamin (vitamin B12): a bacterial conundrum*. Cell Mol Life Sci, 2000. **57**(13-14): p. 1880-93.
38. Vicente, M.d.G.H. and K.M. Smith, *Haem Structure and Function*, in eLS. 2001, John Wiley & Sons, Ltd.
39. Karlson, P., *The nomenclature of tetrapyrroles. A report*. J Clin Chem Clin Biochem, 1981. **19**(1): p. 43-7.
40. Jahn, D., E. Verkamp, and D. Soll, *Glutamyl-transfer RNA: a precursor of heme and chlorophyll biosynthesis*. Trends Biochem Sci, 1992. **17**(6): p. 215-8.
41. Moser, J., et al., *Structure and function of glutamyl-tRNA reductase involved in 5-aminolaevulinic acid formation*. Biochem Soc Trans, 2002. **30**(4): p. 579-84.
42. Kikuchi, G., et al., *The enzymatic synthesis of delta-aminolevulinic acid*. J Biol Chem, 1958. **233**(5): p. 1214-9.
43. Weinstein, J.D. and S.I. Beale, *Separate physiological roles and subcellular compartments for two tetrapyrrole biosynthetic pathways in Euglena gracilis*. J Biol Chem, 1983. **258**(11): p. 6799-807.
44. Senior, N.M., et al., *Comparative studies on the 5-aminolaevulinic acid dehydratases from Pisum sativum, Escherichia coli and Saccharomyces cerevisiae*. Biochem J, 1996. **320** (Pt 2): p. 401-12.
45. Frankenberg, N., D.W. Heinz, and D. Jahn, *Production, purification, and characterization of a Mg2+-responsive porphobilinogen synthase from Pseudomonas aeruginosa*. Biochemistry, 1999. **38**(42): p. 13968-75.

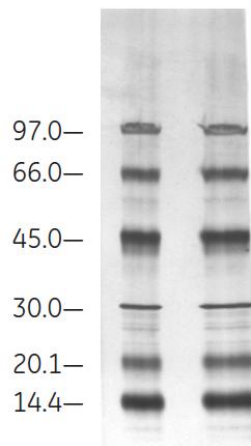
46. Petrovich, R.M., S. Litwin, and E.K. Jaffe, *Bradyrhizobium japonicum* porphobilinogen synthase uses two Mg(II) and monovalent cations. *J Biol Chem*, 1996. **271**(15): p. 8692-9.
47. Bollivar, D.W., et al., *Rhodobacter capsulatus* porphobilinogen synthase, a high activity metal ion independent hexamer. *BMC Biochem*, 2004. **5**: p. 17.
48. Frankenberg, N., J. Moser, and D. Jahn, *Bacterial heme biosynthesis and its biotechnological application*. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2003. **63**(2): p. 115-27.
49. Jordan, P.M. and M.J. Warren, *Evidence for a dipyrromethane cofactor at the catalytic site of E. coli porphobilinogen deaminase*. *FEBS Lett*, 1987. **225**(1-2): p. 87-92.
50. Mauzerall, D. and S. Granick, *Porphyrin biosynthesis in erythrocytes. III. Uroporphyrinogen and its decarboxylase*. *J Biol Chem*, 1958. **232**(2): p. 1141-62.
51. Homuth, G., et al., *Transcriptional control of Bacillus subtilis hemN and hemZ*. *J Bacteriol*, 1999. **181**(19): p. 5922-9.
52. Sasarman, A., et al., *Nucleotide sequence of the hemG gene involved in the protoporphyrinogen oxidase activity of Escherichia coli K12*. *Can J Microbiol*, 1993. **39**(12): p. 1155-61.
53. Raux, E., et al., *A role for Salmonella typhimurium cbiK in cobalamin (vitamin B12) and siroheme biosynthesis*. *J Bacteriol*, 1997. **179**(10): p. 3202-12.
54. Murphy, M.J. and L.M. Siegel, *Siroheme and sirohydrochlorin. The basis for a new type of porphyrin-related prosthetic group common to both assimilatory and dissimilatory sulfite reductases*. *J Biol Chem*, 1973. **248**(19): p. 6911-9.
55. Lobo, S.A., et al., *Functional characterization of the early steps of tetrapyrrole biosynthesis and modification in Desulfovibrio vulgaris Hildenborough*. *Biochem J*, 2009. **420**(2): p. 317-25.
56. Palmedo, G., et al., *Resolution of the nirD locus for heme d1 synthesis of cytochrome cd1 (respiratory nitrite reductase) from Pseudomonas stutzeri*. *Eur J Biochem*, 1995. **232**(3): p. 737-46.
57. Storbeck, S., et al., *A novel pathway for the biosynthesis of heme in Archaea: genome-based bioinformatic predictions and experimental evidence*. *Archaea*, 2010. **2010**: p. 175050.
58. Romao, C.V., et al., *Evolution in a family of chelatases facilitated by the introduction of active site asymmetry and protein oligomerization*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2011. **108**(1): p. 97-102.
59. Brindley, A.A., et al., *A story of chelatase evolution: identification and characterization of a small 13-15-kDa "ancestral" cobaltochelatase (CbiXS) in the archaea*. *J Biol Chem*, 2003. **278**(25): p. 22388-95.
60. Yin, J., et al., *Crystal structure of the vitamin B12 biosynthetic cobaltochelatase, CbiXS, from Archaeoglobus fulgidus*. *J Struct Funct Genomics*, 2006. **7**(1): p. 37-50.
61. Lobo, S.A., et al., *Two distinct roles for two functional cobaltochelatases (CbiK) in Desulfovibrio vulgaris hildenborough*. *Biochemistry*, 2008. **47**(21): p. 5851-7.
62. Dashper, S.G., et al., *Characterization of a novel outer membrane hemin-binding protein of Porphyromonas gingivalis*. *J Bacteriol*, 2000. **182**(22): p. 6456-62.
63. Berry, E.A. and B.L. Trumpower, *Simultaneous determination of hemes a, b, and c from pyridine hemochrome spectra*. *Anal Biochem*, 1987. **161**(1): p. 1-15.
64. Inoue, H., H. Nojima, and H. Okayama, *High efficiency transformation of Escherichia coli with plasmids*. *Gene*, 1990. **96**(1): p. 23-8.
65. Keller, K.L., K.S. Bender, and J.D. Wall, *Development of a markerless genetic exchange system for Desulfovibrio vulgaris Hildenborough and its use in generating a strain with increased transformation efficiency*. *Appl Environ Microbiol*, 2009. **75**(24): p. 7682-91.
66. van der Westen, H.M., S.G. Mayhew, and C. Veeger, *Separation of hydrogenase from intact cells of Desulfovibrio vulgaris. Purification and properties*. *FEBS Lett*, 1978. **86**(1): p. 122-6.

67. Bell, G.R., L. LeGall, and H.D. Peck, *Evidence for the periplasmic location of hydrogenase in Desulfovibrio gigas*. J Bacteriol, 1974. **120**(2): p. 994-7.
68. Teixeira, M., et al., *Nickel-[iron-sulfur]-selenium-containing hydrogenases from Desulfovibrio baculatus (DSM 1743). Redox centers and catalytic properties*. Eur J Biochem, 1987. **167**(1): p. 47-58.
69. Raux-Deery, E., et al., *Identification and characterization of the terminal enzyme of siroheme biosynthesis from Arabidopsis thaliana: a plastid-located sirohydrochlorin ferrochelatase containing a 2FE-2S center*. J Biol Chem, 2005. **280**(6): p. 4713-21.

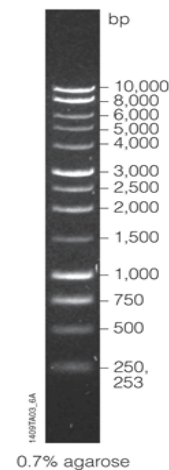
Anexo 1 - Sequências dos *primers* utilizados na amplificação dos 7 mutantes dirigidos de CbiK^P

<i>Primers</i>	<i>Sequência</i>
CbiK^P primer forward <i>cleaved</i>	5'-CCGGCTCATATGGGGGCATGGAGC-3' (corte Nde I)
CbiK^P primer reverse	5'-GAAGAGGCAGGCTAAGCTTACGGAG-3' (corte Hind III)

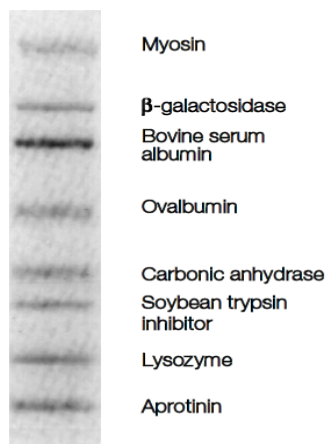
Anexo 2 – Marcador de proteínas de baixo peso molecular da Amersham.



Anexo 3 - Marcador de 1 Kbp da Promega utilizado nos géis de agarose 1 %.



Anexo 4 - Marcador *Prestained SDS-PAGE broad range* da Biorad utilizado nos *Western Blots*.



Anexo 5 - Sequências dos *primers* utilizados nas mutações H154L/H216L-CbiK^P e E184L/H216L-CbiK^P.

Primers	Sequência
CbiK ^P <i>primer forward</i> H216L	5'-CCGGCGACCTCGCCCGCAAC-3'
CbiK ^P <i>primer reverse</i> H216L	5'-GTTGCGGGCGAGGTCGCCGG-3'

Anexo 6 – Sequência de aminoácidos da proteína CbiK^P de *Desulfovibrio vulgaris* Hildenborough

MSRHPMVTRLLCLVFSLIILACSPAFAGHGAPKAQKTGILLVAFGTSVEEARP
ALDKMGDRVRAAHPDIPVRWAYTAKMIRAKLRAEGIAAPSPAELAGMAEEG
FTHVAVQSLHTIPGEEFHGLLETAHAFQGLPKGLTRVSVGLPLIGTTADAEAVA
EALVASLPADRKPGEPVVMFGHGTPHPADICYPLQYYLWRLDPDLLVGTVEG
SPSFDNVMAELDVRKAKRVWLMPLMAVAGDHARNDMAGDEDDSWTSQLAR
RGIEAKPVLHGTAESDAVAAIWLRHLDDALARLN

Anexo 6 – Reagentes utilizados na execução dos trabalhos experimentais.

Reagente	Marca
5-bromo-4-cloro-3-indolil fosfato e azul de nitrotetrazólio (NBT/BCIP)	Fluka
Ácido 5-aminolevulínico	Sigma
Ácido clorídrico 37%	Carlo Ebra Reagents
Ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) 99%	Roth
Ampicilina	Roth
Anti-rabbit IgG (fosfatase alcalina)	Sigma
Azul de coomassie R-250	Thermoscientific
Canamicina	Roth
Catalase de fígado bovino	Sigma
Cloranfenicol	Sigma
Cloreto de cálcio di-hidratado	Merck
Cloreto de cobalto	Sigma
Cloreto de magnésio hexahidratado	Riedel de Haen
Cloreto de potássio	Merck
Cloreto de potássio	Panreac
D-Glucose	Merck
Ditionito de sódio	Sigma
Docedil sulfato de sódio (SDS)	Roth
Etanol absoluto	Carlo Ebra Reagents

Ferricianeto de potássio	Merck
Glicerol	VWR - Prolabo
Glicerol 85%	Merck
Glicina	VWR - Prolabo
Hemoglobina de sangue bovino	Sigma
Hidróxido de potássio	Merck
Hidróxido de sódio	Eka
Hidroxifosfato de sódio	Roth
Imidazole 99%	Panreac
Isopropil-β-D-tiogalactósideo (IPTG)	Roth
Lactato de sódio 50%	Riedel de Haen
L-Arabinose 99%	Sigma
L-Cisteína	Fluka
Leite magro em pó	Regilait
Lisozima	Sigma
Marcador 1 Kbp	Promega
Marcador de baixo peso molecular para proteínas	Amersham biosciences
Marcador de DNA SYBR Safe	Invitrogen
Metanol	Carlo Ebra Reagents
Mioglobina	Sigma
N,N,N',N'-Tetrametiletenodiamina (TEMED)	Sigma
n-Butanol	Sigma
Nicotinamida adenina dinucleotídeo (NAD⁺)	Sigma
Persulfato de amônia	Riedel de Haen
Pridina	Sigma
Proteína <i>standard</i> com albumina de soro humana e gamaglobulina	Sigma
<i>Qiaquick gel extraction kit</i>	Qiagen
<i>Qiaquick miniprep kit</i>	Qiagen
<i>Qiaquick pcr purification kit</i>	Qiagen
Reagentes A e B para BCA	Thermoscientific
Resina dietilaminoetil (DEAE)	Sigma
Sulfato de ferro heptahidratado	Riedel de Haen
Sulfato de magnésio heptahidratado	Merck
Sulfato de níquel hexahidratado	Sigma
Taq polimerase	Biolabs
Tetraciclina	Sigma
Tris 99,9%	Roth
Tween 20	Sigma
<i>Ultrapure agarose</i>	Invitrogen
Vent taq polimerase	Biolabs